

Aus dem Bereich Innere Medizin III – Klinisch-Experimentelle Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Prof. Dr. med. U. Laufs

---

# **Die Bedeutung der Lysyl Oxidase für das strukturelle Remodeling im Rahmen von Vorhofflimmern**

---

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

der Medizinischen Fakultät der  
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012



vorgelegt von

**Anna Katharina Theobald**

**geb. am 31.01.1986 in St. Wendel**

*„Don't fear change,  
fear stagnation.“*

Japanische Weisheit

*Für meine Eltern*

*Gisela und Eckhard Theobald*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	1
1.1. Profibrotische Effekte der Lysyl Oxidase im strukturellen Remodeling während Vorhofflimmern	1
1.2. Lysyl oxidase contributes to fibrotic remodeling during atrial fibrillation	3
<b>2. Einleitung</b>	5
2.1. Definition, Klassifikation und Epidemiologie von Vorhofflimmern	5
2.2. Pathophysiologische Grundsätze von Vorhofflimmern	
- Remodelingprozesse und Auswirkungen auf die atriale Myokardmechanik	6
2.2.1. Circulus vitiosus: Strukturelles Remodeling bei der Genese von Vorhofflimmern	6
2.2.2. Elektrisches Remodeling: The multiple-wavelet-hypothesis und ihre Folgen	8
2.3. Molekularbiologische Grundsätze von Vorhofflimmern	
- Aberrationen im Zellstoffwechsel und pathogenetisches Potenzial verschiedener Metaboliten	9
2.3.1. Signaltransduktion mit arrhythmogenem Vermögen: Vom Metaboliten im kardiovaskulären System zu strukturellem Remodeling im Vorhofmyokard	9
2.3.2. Lysyl Oxidase: enzymatischer Parameter für zunehmende Fibrose	10
2.3.3. Transforming growth factor $\beta$ : fibrogenetisches Zytokin	12
2.3.4. Fibronektin: Baustein einer fibroproliferativen Matrix	13
2.4. Eigene Fragestellung	15
<b>3. Material und Methodik</b>	16
3.1. Material	16
3.1.1. Antikörper	16
3.1.2. Primer	17
3.1.3. Gele für Western Blot	17
3.1.4. Gele für Polymerasekettenreaktion	18

3.1.5.	Enzyme und Kits .....	18
3.1.6.	Medien, Lösungen und Puffer.....	19
3.1.7.	Verbrauchsmaterial.....	20
3.1.8.	Chemikalien und sonstige Reagenzien.....	20
3.1.9.	Geräte .....	22
3.1.10.	Software .....	23
3.2.	Materialgewinnung .....	24
3.2.1.	Zellkultur .....	24
3.2.2.	Humane linksatriale Appendices .....	26
3.2.3.	Versuchstiere.....	28
3.3.	siRNA-Transfektion .....	30
3.4.	Proteinexpression und Western Blot .....	31
3.4.1.	Proteinbestimmung nach Lowry .....	32
3.4.2.	Gelelektrophorese .....	33
3.4.3.	Proteintransfer .....	33
3.4.4.	Antikörperinkubation .....	34
3.5.	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	35
3.5.1.	RNA-Isolation .....	35
3.5.2.	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	36
3.5.3.	Reverse Transkription .....	36
3.5.4.	PCR.....	37
3.5.5.	Real-Time-PCR .....	38
3.6.	Immunhistochemische Färbungen .....	39
3.6.1.	Bestimmung des Kollagen-Gesamtgehalts .....	39
3.6.2.	Bestimmung des Gehalts an Kollagen-Crosslinks.....	39
3.7.	Immunfluoreszenzanalysen .....	40
3.7.1.	LOX-Immunfluoreszenzfärbung .....	40
3.7.2.	Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung.....	41
3.7.3.	$\alpha$ -sarkomerisches Aktin-Immunfluoreszenzfärbung.....	41
3.7.4.	Digitalisierung der immunfluoreszierenden Färbungen.....	41
3.8.	Statistische Auswertung.....	42

<b>4. Ergebnisse</b>	43
4.1. Erhöhter Kollagengehalt und gesteigertes Kollagen-Crosslinking im Vorhofmyokard von Patienten mit Vorhofflimmern	43
4.2. Erhöhte LOX-Expression im Vorhofmyokard von Patienten mit Vorhofflimmern	44
4.3. LOX-Expression in kardialen Fibroblasten	45
4.4. Rac1-abhängige Regulation der LOX-Proteinexpression durch AngII	46
4.5. Regulation der LOX-Proteinexpression durch CTGF	47
4.6. CTGF-Abhängigkeit des AngII-Signals auf die LOX-Proteinexpression	47
4.7. Reduktion der LOX-Proteinexpression durch Statine	48
4.8. Reduktion des Kollagengehalts und des Kollagen-Crosslinkings durch Statine	49
4.9. Erhöhte TGF- $\beta$ 1-Expression im Vorhofmyokard von Patienten mit Vorhofflimmern	50
4.10. Regulation der CTGF-mRNA-Expression durch TGF- $\beta$ 1	50
4.11. Regulation der LOX-Proteinexpression durch TGF- $\beta$ 1	50
4.12. Regulation der Rac1-Expression durch TGF- $\beta$ 1	51
4.13. Erhöhte Fibronectin-Proteinexpression im Vorhofmyokard von Patienten mit Vorhofflimmern	52
4.14. LOX-abhängige Regulation der Fibronectin-Proteinexpression durch AngII und CTGF	52
4.15. Reduktion der Fibronectin-Proteinexpression durch Statine	53
<b>5. Diskussion</b>	54
5.1. Identifizierung von Molekülen, die unter Vorhofflimmern einer Expressionsänderung unterliegen	54
5.2. Lokalisation im myokardialen Zellverband	55
5.3. Charakterisierung der Interaktionen <i>in vitro</i>	56
5.4. Verifizierung der Ergebnisse <i>in vivo</i>	59
5.5. Krankheitsprävention und potentielle Therapieoptionen	60
5.6. Limitationen der Studie	62
5.7. Ausblick	63

<b>6. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>8. Dank.....</b>	<b>96</b>

# Abkürzungsverzeichnis

---

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg, mg, g	Mikrogramm, Milligramm, Gramm
µl, ml, l	Mikroliter, Milliliter, Liter
Abb	Abbildung
ACC	American College of Cardiology
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AF	atrial fibrillation
AGFA	Aktiengesellschaft für Anilinfabrikation
AHA	American Heart Association
AngII	Angiotensin II
ANOVA	analysis of variance
Aq dest	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ARMYDA	Atorvastatin for Reduction of Myocardial Dysrhythmia
	After Cardiac Surgery
AT1-Rezeptor	AngiotensinII-Rezeptor Typ I
BAPN	LOX small molecule inhibitor b-propioaminonitrile
bp, kbp	Basenpaare, Kilobasenpaare
bpm	beats per minute
BSA	bovine serum albumin
C	Kontrolle
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTGF	Connective tissue growth factor
Cu <sup>2+</sup>	zweifach positiv geladenes Kupferion
Cys	Cystein
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DAPI	Diamidino-phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure

---



---

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	DL-Dithiothreitol
ECL-Kit	Western Blot Detecting Kit
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESC	European Society of Cardiology
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FKS	fötales Kälberserum
FS	Fraction of Shortening (Verkürzungsfraction)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEFs	Guanin-Nucleotid-Exchange-Factors
GTP, GDP	Guanosintriphosphat, Guanosindiphosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperaziny-N'-2-ethanesulfonsäure
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
IgM, IgG	Immunglobulin M, Immunglobulin G
IVSd	interventrikuläre Septumdicke
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
LOX	Lysyl Oxidase
LOXL1,-2,-3,-4	lysyl oxidase like proteins 1, 2, 3, 4
LTQ	Lysintyrosylquinon
LV	linker Ventrikel
LVEDd	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVESd	linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
mA, A	Milliampere, Ampere
MG	Molekulargewicht
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MHC	$\alpha$ -myosin heavy chain
Mio, Mrd	Million, Milliarde
n	Anzahl
NaCl	Natrimchlorid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid

---

---

nm, µm, mm, cm, m	Nanometer, Mikrometer, Millimeter, Zentimeter, Meter
nM, µM, mM, M	Nanomolar, Mikromolar, Millimolar, Molar
NSC	Rac1 small molecule inhibitor NSC23766
p	Signifikanzwert
p1	Passage 1
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pH-Wert
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
po	per os
ProLOX	Vorläuferpeptid der Lysyl Oxidase
RacET	Transgene Mäuse mit herzspezifischer Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1
RAS	herzspezifisches lokales Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
ROX	X-Rhodamin
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Real-Time-Polymerasekettenreaktion
RV	Rechter Ventrikel
s, min, Std	Sekunde, Minute, Stunde
sc-CTGF	Zellen ohne CTGF-Knockdown (aktivierbar durch AngII)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SEM	Standard Error of the Mean (Mittelwert ± Standardfehler)
Ser	Serin
si-CTGF	Zellen unter CTGF-Knockdown (nicht aktivierbar durch AngII)
Sirius Red F3BA	Farbstoff für Kollagen
siRNA	small interfering RNA
SMAD-Proteine	intrazelluläre Transduktionsmoleküle eines transforming growth factor β- Reizes
SR	Sinusrhythmus
SSC	saline-sodium citrate
SYBR-Green	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)- propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}- 3-methyl-benzothiazol-3-ium-

---

---

	Kation
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TGF- $\beta$ 1-TG	Transgene Mäuse mit kardialer Überexpression von TGF- $\beta$ 1
Tiam1	Rac1-spezifischer Guanin-Nucleotid-Exchange-Factor
TrioN	Rac1-spezifischer Guanin-Nucleotid-Exchange-Factor
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat
U/min	Umdrehungen pro Minute
vs	Versus
WT	Wildtyp

---

# 1. Zusammenfassung

## 1.1. Profibrotische Effekte der Lysyl Oxidase im strukturellen Remodeling während Vorhofflimmern

Als häufigste Herzrhythmusstörung mit altersabhängigem Prävalenzzuwachs und Risikofaktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität, stellt Vorhofflimmern eine besondere Herausforderung dar. Dennoch kennzeichnet die Rhythmusstörung das Fehlen eines definierten pathogenetischen Substrates. In diesem Zusammenhang überprüft die vorliegende Arbeit die Hypothese einer Beteiligung der Lysyl Oxidase am Signaltransduktionsweg, welcher die Ausbildung einer interstitiellen Fibrose im Rahmen von atrialem Remodeling bei Vorhofflimmern bedingt.

Proben aus gepaarten linksatrialen humanen Appendices von Patienten mit Sinusrhythmus und Vorhofflimmern zeigten einen erhöhten Gehalt an Kollagen ( $65 \pm 7$  vs.  $37 \pm 5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein), sowie ein 2,5-fach gesteigertes Kollagencrosslinking in erkranktem Gewebe. RT-PCR ( $218 \pm 42\%$ ) und Western Blot Analysen ( $250 \pm 13\%$ ) dieser Proben dokumentierten eine Zunahme der Proteinexpression der Lysyl Oxidase im flimmernden Vorhof. Des Weiteren bestanden Assoziationen zu einer Syntheseaktivierung von AngiotensinII, Connective tissue growth factor, Transforming growth factor- $\beta 1$  und Fibronektin ( $236 \pm 38\%$ ), sowie zu einer vermehrten Aktivität der Rac1-GTPase im Vergleich zu Patienten im Sinusrhythmus.

Um die Relevanz des Transforming growth factor- $\beta 1$  näher zu charakterisieren, wurde ein Mausmodell genutzt, dessen transgene Tiere sich durch Überexpression von Transforming growth factor- $\beta 1$  auszeichneten. Bezogen auf den Wildtyp, konnte eine Expressionssteigerung sowohl der Lysyl Oxidase, als auch von Connective tissue growth factor und Rac1 beobachtet werden.

In neonatalen kardialen Rattenfibroblasten vermochte der Rac1 spezifische small molecule inhibitor NSC23766 die Angiotensin II induzierte Expressionssteigerung der Lysyl Oxidase vollständig zu unterdrücken ( $214 \pm 16\%$ ). Eine Supprimierung des Connective tissue growth factor mittels siRNA Transfektion konnte den Expressionszuwachs der Lysyl Oxidase ebenfalls vollständig hemmen. Des Weiteren unterlag der Fibronektin-Metabolismus einer stimulierenden Regulation durch AngiotensinII und Connective tissue growth factor, welche durch Präinkubation mit dem Lysyl Oxidase spezifischen small-molecule-inhibitor BAPN verhindert werden konnte.

Linke Vorhöfe transgener Mäuse mit kardialer Überexpression von Rac1 (RacET), welche durch spontane Manifestation von Vorhofflimmern in hohem Alter gekennzeichnet sind, wiesen im Vergleich mit dem Wildtyp eine gesteigerte Connective tissue growth factor-, Lysyl Oxidase- ( $187 \pm 7\%$ ) und Fibronectinexpression ( $627 \pm 146\%$ ) auf. Gleichzeitig bestand eine Assoziation zu einem erhöhten Kollagengehalt ( $28 \pm 2 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) und Kollagencrosslinking ( $10 \pm 0.7$ ) im atrialen Gewebe der transgenen Tiere, verglichen mit den Wildtypen ( $20 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein;  $5 \pm 0.9$ ). Eine mehrmonatige Applikation von Rosuvastatin hemmt die Aktivität der Rac1 GTPase und konnte so die Expressionssteigerung der Lysyl Oxidase und Fibronectin supprimieren. Außerdem wurde eine Inhibierung des Kollagenzuwachses, sowie des Kollagencrosslinkings, beobachtet, was der Fibrosierungstendenz entgegengewirkt.

Diese Studie veranschaulicht den Signalweg, welcher die interstitielle Fibrose in der Pathogenese von Vorhofflimmern induziert. Linksatriales Myokard von Patienten mit Vorhofflimmern ist, neben einem erhöhten Kollagengehalt und Kollagencrosslinkings, durch eine gesteigerte Lysyl Oxidase- und Fibronectinexpression charakterisiert. In kardialen Fibroblasten vermittelt die Rac1 GTPase die Expressionszunahme von Fibronectin in Abhängigkeit von der Lysyl Oxidase und Connective tissue growth factor. Eine Inhibition dieses Signalwegs vermag einen Angriffspunkt für neuartige kausalitätsbezogene Therapieansätze in der Prophylaxe von profibrotischen Alterationen während Vorhofflimmern darzustellen.

## 1.2. Lysyl oxidase contributes to fibrotic remodeling during atrial fibrillation

Atrial fibrillation is the most common cardiac arrhythmia and a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. Nevertheless there is an insufficiency in the knowledge of the pathogenetic pathways leading to the fibrillating movements of the myocardium. The present work investigates the signal transduction leading to interstitial fibrosis in the pathogenesis of atrial fibrillation and atrial remodeling.

Samples of the left atrial appendage from patients with atrial fibrillation showed higher collagen content ( $65 \pm 7$  vs.  $37 \pm 5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein) and 2.5-fold increased collagen crosslinking compared to patients with sinus rhythm. RT-PCR ( $218 \pm 42\%$ ) and Western Blot analysis ( $250 \pm 13\%$ ) revealed that the left atrial appendage of patients with atrial fibrillation are characterised by increased lysyl oxidase expression. This was associated with increased expression of angiotensin II, connective tissue growth factor, transforming growth factor- $\beta 1$ , fibronectin ( $236 \pm 38\%$ ) and increased Rac1 activity compared to patients with sinus rhythm.

To further distinguish the relevancy and the regulating capacity of transforming growth factor- $\beta 1$ , we used a transgenic mouse model. Animals characterized by an overexpression of transforming growth factor- $\beta 1$  showed higher levels of lysyl oxidase-, connective tissue growth factor- and rac1-synthesis, referred to their wildtype conspecifics.

In neonatal cardiac rat fibroblasts, the Rac1 specific small molecule inhibitor NSC23766 completely prevented the angiotensin II induced upregulation of lysyl oxidase ( $214 \pm 16\%$ ) expression. Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA transfections completely inhibited AngII induced lysyl oxidase expression as well. Furthermore, the lysyl oxidase specific small molecule inhibitor BAPN prevented an angiotensin II and connective tissue growth factor induced fibronectin expression.

Left atria of transgenic mice with cardiac overexpression of Rac1, which develop atrial fibrillation at high age, exhibited upregulation of connective tissue growth factor as well as lysyl oxidase ( $187 \pm 7\%$ ) and fibronectin ( $627 \pm 146\%$ ) expression compared to wildtype. This was associated with an increased collagen content ( $28 \pm 2$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein) and crosslinking ( $10 \pm 0.7$ ) in the atrial tissue of the transgenic mice compared to wildtypes ( $20 \pm 0.4$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein;  $5 \pm 0.9$ ). The application of rosuvastatin for several months prevented the increase of lysyl oxidase and fibronectin expression and decreased the fibroproliferative remodeling by reducing the increase of collagen content and crosslinking.

This study illustrates the signaling pathway leading to interstitial fibrosis in the pathogenesis of atrial fibrillation. Left atrial myocardium of patients with atrial fibrillation is characterized by

increased lysyl oxidase and fibronectin expression as well as collagen cross-linking. In cardiac fibroblasts, Rac1 GTPase mediates upregulation of fibronectin via lysyl oxidase and connective tissue growth factor. Inhibition of this signaling pathway may therefore represent a target for the prevention of profibrotic alterations during atrial remodeling.

## 2. Einleitung

### 2.1. Definition, Klassifikation und Epidemiologie von Vorhofflimmern

Vorhofflimmern ist eine heterotope Erregungsbildungsstörung mit resultierender unkoordinierter atrialer Kontraktion, die zu einer kontinuierlich reduzierten Muskelmechanik des Myokards führt. In der Folge wird die hämodynamische Wirksamkeit der Vorhofaktion minimiert bzw. aufgehoben [46]. Elektrokardiographisch imponieren schnelle Fibrillationen mit Varianz in Größe und Form sowie im Zeitpunkt ihres Auftretens [40]. Vorhofflimmern ist die häufigste supraventrikuläre Arrhythmie [46].

Die Variabilität der klinischen Symptomatik erstreckt sich von völliger Beschwerdefreiheit über Palpitationen, Dyspnoe, Sehstörungen, Schwindel, Leistungseinschränkung, Übelkeit, Brust- und Kopfschmerz bis hin zu Kollapsneigung und Synkopen. Die klinischen Erscheinungsformen korrelieren dabei in der Regel mit dem Grad der hämodynamischen Beeinträchtigung und den Auswirkungen auf die Ventrikelkontraktur [62;109].

Die gebräuchlichste Einteilung, die auch Einzug in die Leitlinien der American Heart Association (AHA), des American College of Cardiology (ACC) und der European Society of Cardiology (ESC) gefunden hat, kategorisiert Vorhofflimmern entsprechend seiner Dauer und Remissionspotenz in drei Erscheinungsformen [46]:

1. *Paroxysmales Vorhofflimmern*: Rekurrente Episoden von weniger als sieben Tagen mit spontaner Terminierung
2. *Persistentes Vorhofflimmern*: Rekurrente Episoden von mehr als sieben Tagen mit möglicher Terminierung durch medikamentöse Therapie oder Kardioversion
3. *Permanentes Vorhofflimmern*: Anhaltende Tachykardie ohne Erfolgsaussichten der Terminierung durch Kardioversion

Als weitverbreitetste chronische kardiale Arrhythmie des Menschen ist die Prävalenz von Vorhofflimmern abhängig vom Lebensalter und Geschlecht. Während sie bei den 50-Jährigen noch bei 0,5% liegt, steigt sie mit zunehmendem Alter kontinuierlich an und beträgt bei den 80 bis 90-Jährigen schon 10%. Die Häufigkeit des Auftretens bei Männern ist 2,5fach höher als bei Frauen [9;65;170;171]. Während in den USA im Jahr 2006 etwa 2,2 Mio. Einwohner unter Vorhofflimmern litten, lag dieser Wert in der EU bei 4,5 Mio. Die Inzidenz verdoppelt sich mit jeder Lebensdekade. Diese Altersabhängigkeit führt dazu, dass 70% der Erkrankten zwischen 65 und 85 Jahre alt sind [40;42;46;50].



Aufgrund seiner Häufigkeit gilt Vorhofflimmern als einer der Hauptgründe für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität mit einem Mortalitätsfaktor von 1,5 für Männer und 1,9 für Frauen [9;110]. Insbesondere das Schlaganfallrisiko ist unter dem Leiden an der Rhythmusstörung um das 3 bis 7-fache erhöht, abhängig von dem Ausmaß folgender ergänzender Pathologien: Neben den klinischen Risikofaktoren, wie Alter, Diabetes, arterielle Hypertonie, kongestive Herzinsuffizienz, KHK, Herzklappenerkrankungen und Myokardinfarkt, sprechen vor allem die echographischen Risikofaktoren für die Beteiligung eines strukturellen Remodelings an der Genese von Vorhofflimmern. So steigt die Wahrscheinlichkeit Vorhofflimmern zu entwickeln mit der Größe des linken Vorhofs und einer Verdickung der linken Ventrikelwand [8;10;161;170].

Im Rahmen der demographischen Entwicklungstendenz der Industriestaaten, ist eine Zunahme der Anzahl von Patienten mit Vorhofflimmern in den nächsten 50 Jahren abzusehen [50]. Bereits von 1996 bis 2006 ist die Zahl an Hospitalisierungen wegen der Rhythmusstörung um 66% gestiegen. So entstehen jährliche Behandlungskosten in Höhe von ca. € 13,5 Mrd. [46]. Für das 21. Jahrhundert wird bereits eine „Epidemie von Vorhofflimmern“ mit enormer ökonomischer Belastung prognostiziert [28;157].

Umso wichtiger erscheint es geeignete Behandlungsstrategien zu konzipieren, die, im Vergleich zu den bisherigen Therapieoptionen, die ursächlichen Aspekte der Erkrankung in den Mittelpunkt rücken.

## **2.2. Pathophysiologische Grundsätze von Vorhofflimmern**

### **- Remodelingprozesse und deren Auswirkungen auf die atriale Myokardmechanik**

#### **2.2.1. Circulus vitiosus: Strukturelles Remodeling bei der Genese von Vorhofflimmern**

Über 90% aller unter Vorhofflimmern leidenden Menschen präsentieren Strukturveränderungen im atrialen Zellverband [133]. Im Mittelpunkt dieses strukturellen arrhythmogenen Remodelings der zellulären Vorhofkomposition, steht die Entwicklung einer hyperfibrotischen, funktionseingeschränkten Gewebeexpansion [4;86]. Ob diese atriale Dilatation Ursache oder Folge des Vorhofflimmerns darstellt, ist derzeit noch ungewiss und erschwert sämtliche ätiologische Erklärungsversuche. Insgesamt scheint das Gewebe des Vorhofs deutlich empfänglicher für profibrotische Umstrukturierungen zu sein, als das des Ventrikels [58]. Das

Interstitium des Myokards setzt sich größtenteils aus Kollagenfibrillen des Typs I und III zusammen (85%), einem dehnbaren, aber dennoch recht festen, schwer-elastischen Bindegewebetypus. Aufgrund dieser relativen Starre, haben bereits geringe quantitative Änderungen der Fibrillenkonzentration erhebliche Auswirkungen auf das passive mechanische Verhalten des menschlichen Herzens [24;165]. Dabei besteht die ungünstigste, weil den höchsten Grad an Starre aufweisende Konstellation aus einer vorherrschenden Komposition aus Kollagen Typ I, einem großen Fibrillendurchmesser und einem hohen Grad an Kollagen-Crosslinks, wohingegen die umgekehrte Kombination aus vermehrtem Kollagen Typ III-Gehalt, einer weniger starken Zunahme des Fibrillendurchmessers und einer geringeren Anzahl von zusätzlichen Crosslinks die passiven Mechanismen des Myokards weniger einschränkt [118;123;13].

Ein erhöhter Kollagengehalt konnte bei Patienten mit Vorhofflimmern auch histologisch nachgewiesen werden [45]. Dabei geht die Anhäufung von Kollagenfibrillen zum einen mit einem Untergang des degenerativen myokardialen Herzparenchyms einher (=reparative Fibrose), zum anderen lagern sich hyperplastische Interstitiumzellen zwischen die Myozytenbündel und stören somit deren Kommunikation über Gap-junctions (=reaktive Fibrose) [6;142]. In Tiermodellen lässt sich die Hypothese, „Tachykardie bedingt eine interstitielle Vorhoffibrosierung“, nachweisen. Dabei wurde durch ventrikuläres Tachypacing, über den Zwischenschritt einer Kardiomyopathie, eine atriale interstitielle Fibrosierung induziert, welche den Remodeling-Vorgängen im Rahmen der Genese von Vorhofflimmern beim Menschen gleicht. Die vermehrte Fibrosierung führt hier zu einem reduzierten elektrischen Reizweiterleitungsvermögen, welches den Verlauf der Erregungsausbreitung in Form eines unidirektionalen Blocks verhindert [5;86]. Diese Pathologie erhöht die Wahrscheinlichkeit von Reentries und bedingt somit wiederum die Genese von Vorhofflimmern [32]. Da die Vorhoftachykardie an sich aber, wie oben beschrieben, zu einer kontinuierlichen Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen führt, wird die Progression der Fibrosierung durch Vorhofflimmern weiter vorangetrieben [91]. Dieser Kreislauf führt also zur erneuten Induktion bzw. zur Aufrechterhaltung der Rhythmusstörung und lässt eine Übertragung von Wijffels Beobachtung „Vorhofflimmern erzeugt Vorhofflimmern“ aus der Elektrophysiologie auf die strukturellen Adaptationsvorgänge im atrialen Myokard zu [169]. Diesen Circulus vitiosus gilt es zu unterbrechen, um das Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern oder zumindest zu bremsen und eine Verbesserung des Outcomes zu gewährleisten. Hierzu soll diese Arbeit ihren Beitrag leisten.

### 2.2.2. Elektrisches Remodeling: The multiple-wavelet-hypothesis und ihre Folgen

Die elektropathophysiologischen Aberrationen unter Vorhofflimmern beschreibt Moe et al. anhand der „multiple-wavelet-hypothesis“: Die unkoordinierten Flimmeraktionen werden auf multiple, mobile, autonom zirkulierende Erregungswellen zurückgeführt; so genannte Mikro-Reentrys, die sich durch kontinuierliche Variation in Initialisierung, Termination, Größe, Konfiguration und Lokalisation auszeichnen. Für die Stabilität dieser dynamischen Erregungskreise gilt: Je höher die Anzahl an parallelen Aktivitäten und je kürzer die Kreisbahn, desto unwahrscheinlicher das Sistieren des Vorhofflimmerns [77;103]. Der Einfluss der strukturellen Remodelingprozesse auf die Elektrophysiologie ist dabei unabdingbar. Denn die Maximalzahl an Mikro-Reentrys ist auf die Menge des erregbaren Gewebes begrenzt. Ein großer Vorhof kann folglich mehr Kreiserregungen beherbergen und ist somit empfindlicher für Flimmeraktivitäten [23]. Gleichzeitig unterliegt der Reentry-Charakter einer Abhängigkeit von lokalen myokardialen Bedingungen in Refraktärzeit und Leitungseigenschaften: Wellenlänge der Erregung = Refraktärzeit  $\times$  Leitungsgeschwindigkeit. Eine kurze Wellenlänge prädisponiert dabei für das Auftreten von Vorhofflimmern. Strukturaberrationen hinsichtlich eines dilatierten fibrosierten Vorhofs, dem eine gestörte Kommunikation zwischen den einzelnen Myokardzellen zugrunde liegt und somit die Leitungsgeschwindigkeit reduziert, begünstigen also offensichtlich die Permanenz der Flimmerbewegung. Die Fibroseareale stellen Hindernisse für die Erregungsausbreitung dar, wodurch die Synchronität der Vorhofdepolarisation ausbleibt und heterogene Bereiche bezüglich der Refraktärzeit entstehen („dispersion of refractoriness“). Abbildung 1 veranschaulicht die Auswirkung vermehrter Fibrosierung auf die myokardiale Elektrophysiologie. Die Kombination aus asymmetrischer Expansion der Erregung und der lokalen Diskrepanz der Refraktärzeiten vermag die Vulnerabilität des Vorhofmyokards bezüglich kreisender Erregungen zu erhöhen und Reentries als Antwort auf einen externen Reiz zu induzieren [120;149]. Diese Trigger sind meist Extrasystolen, sogenannte ektope atriale Foci, die zu 50% den Pulmonalvenen entstammen, oder auch lokale Ischämien und Inflammationen, sowie Änderungen der atrialen Wandspannung, Stimulation des vegetativen Nervensystems oder Alkoholintoxikation [40;64;82;109;110;135;136]. Unmittelbar nach der Initiation beginnt, als Antwort auf die Kalziumüberladung durch die rasche Depolarisationsfrequenz, eine Modulation elektrischer Gegebenheiten. Diese Mechanismen atrialen Remodelings unterstützen ihrerseits die Aufrechterhaltung der Flimmerbewegung durch Förderung der Reentry-Genese und begünstigen die Persistenz der Rhythmusstörung entsprechend Wijffels Hypothese „atrial fibrillation begets atrial fibrillation“ [14;41;51;105;109;160;169].

## **2.3. Molekularbiologische Grundsätze von Vorhofflimmern**

### **- Aberrationen im Zellstoffwechsel und pathogenetisches Potenzial verschiedener Metaboliten**

#### **2.3.1. Signaltransduktion mit arrhythmogenem Vermögen: Vom Metaboliten im kardiovaskulären System zu strukturellem Remodeling im Vorhofmyokard**

Grundlegende Forschungsarbeiten zur molekularbiologischen Ätiologie von Vorhofflimmern konnten bereits eine Assoziation der Rhythmusstörung mit Angiotensin II ausmachen. Der Mediator greift gleich mehrfach in die kardiovaskuläre Signaltransduktion ein und vermag auch in der Genese von Vorhofflimmern und der Pathophysiologie der Myokardfibrose eine potenzielle Rolle zu spielen [52;53;87]. Im Renin-Angiotensin-System führt eine Ausschüttung von AngII zu einer Vasokonstriktion, die die Nachlast am Herzen erhöht, und somit eine linksventrikuläre Hypertrophie induziert. Indirekt wird so auch der Vorhof belastet. Denn auch hier steigt der Druck, was in einer Erhöhung der Wandspannung resultiert [134]. Diese persistente Druckbelastung führt zu Gegenregulationsmechanismen des Gewebes. Es kommt zum progressiven strukturellen Remodeling, das durch veränderte Wandbedingungen auch Einfluss auf systolische und diastolische Funktionen nimmt [16]. Auch Li. et al. konnten den profibrotischen Einfluss von AngII beweisen, indem sie nach Inkubation mit dem Mediator eine Steigerung des Kollagen I- & III-Gehalts detektierten. Atriale Proliferation, Wachstum und Differenzierung wurden angeregt [87]. Gleichzeitig ist AngII, durch die Fähigkeit zur Regulation der Rac1-GTPase, auch für die Aktivierung der NADPH-Oxidase verantwortlich, welche ihrerseits die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies beeinflusst. Dabei wird zunächst durch posttranslationale Isoprenylation eine Translokalisierung von Rac1 vom Zytosol zur Zellmembran bewirkt. Dort wird gebundenes GTP zu GDP gespalten, was die Rac1-GTPase inaktiviert und zu ihrer ursprünglichen Position zurückführt. In Folge der Rac1-Aktivität kommt es zu einer Stimulation und Interaktion der NADPH-Oxidase-Untereinheiten und schließlich zur Bildung von Sauerstoffradikalen, deren proinflammatorischer und profibrotischer Effekt bewiesen ist [31;55;89;138]. So gelten reaktive Sauerstoffspezies als Substrat in der Pathogenese von myokardialem Remodeling, atrialer Thrombosierung und Atherosklerose [3;36;75]. Die Inhibierung der Rac1-GTPase vermag die NADPH-Oxidase getriggerte Produktion der Superoxide zu reduzieren und der Fibrosierungstendenz entgegen zu wirken [1;31;83]. Als Initiator von strukturellem Remodeling zu Gunsten einer vermehrten Fibrosierung und Aktivator der Rac1-GTPase, welche entscheidenden Einfluss auf die Signaltransduktion beim Vorhofflimmern nimmt, rückt AngII zunehmend in den Mittelpunkt der kardialen Remodelingforschung [1;31;53;74;87;88]. In Vorstudien wurden bereits

Quantitätsmessungen von AngII in linken Herzhohren von Patienten mit Vorhofflimmern mittels ELISA durchgeführt und mit solchen verglichen, die sich nachweislich im Sinusrhythmus befanden. Das Ergebnis zeigte eine deutliche Zunahme der Proteinexpression von AngII bei erkrankten Personen. Der 7fach erhöhte Gewebegehalt lässt also auf eine Beteiligung des Moleküls im Rhythmusgeschehen des Vorhofs schließen [2].

Als weiterer Modulator fibroproliferativen Remodelings gilt der connective tissue growth factor, der die Zusammensetzung und den Aufbau der extrazellulären Matrix im Sinne einer Überexpression von Kollagen TypI und Fibronectin beeinflusst. Studien zur Charakterisierung seiner Bedeutung für die strukturellen pathogenetischen Mechanismen bei Vorhofflimmern, postulieren eine Involvierung von CTGF in die AngII-/NADPH-Oxidase-Signaltransduktionskette. Eine Inhibierung der Rac1-GTPase bewirkte die Supprimierung einer AngII-getriggerten Proteinexpressionssteigerung von CTGF [2;26;107]. Außerdem konnte die Überexpression des Mediators CTGF, neben AngII, auch durch TGF- $\beta$ , dem bekanntesten profibrotischen Wachstumsfaktor, induziert werden [102].

Dennoch bleiben einige Aspekte des Signalwegs ungeklärt. Einen schematischen Überblick gibt Abbildung 2.

### **2.3.2. Lysyl Oxidase: enzymatischer Parameter für zunehmende Fibrose**

#### **2.3.2.1. Charakterisierung und Funktion**

Die Lysyl Oxidase ist eine Aminoxidase, welche die extrazellulären Bindegewebsstrukturen Elastin und Kollagen miteinander und untereinander verlinkt und so zur gesteigerten Ablagerung von unlöslichen Kollagenfibrillen führt [146]. Diese Verantwortlichkeit für die Unlöslichkeits- und Stabilitätssteigerung der extrazellulären Matrix rückt das Enzym immer weiter ins Zentrum des Forschungsinteresses. Insbesondere für Pathologien hinsichtlich der Homöostase von Komponenten des Interstitiums, erfährt LOX bzw. sein Vorläuferprotein steigende ätiologische Relevanz: So ist beispielsweise eine veränderte LOX-Expression in fibrotischen Krankheiten wie Leber-, Lungen- oder Nierenfibrose erwiesen. Des Weiteren scheinen Tumorprogression, Metastasierung, das polyzystische Ovarialsyndrom, kardiovaskuläre Erkrankungen, wie das Aortenaneurysma, sowie neurodegenerative Krankheiten, wie die Alzheimer-Demenz, mit einem pathologischen LOX-Metabolismus einherzugehen [71;34;115;158]. Unzureichende Klärung hat dagegen die Untersuchung des arrhythmogenen Potenzials von LOX auf myokardialer Ebene erfahren, die für eventuelle

Therapieoptionen von Vorhofflimmern, gerade im Hinblick auf die Inhibierung der mit der Erkrankung assoziierten Fibrosesteigerung, von Bedeutung sein könnte.

Biochemisch betrachtet gehört die Aminoxidase in die Familie der LOX-Proteine, bestehend aus LOX und vier weiteren LOX-like-proteins (LOXL-1,-2,-3 und -4), welche in Vorkommen und mRNA-Expressionsmuster stark variieren. So spielen im kardiovaskulären System lediglich LOX, LOXL-1 und LOXL-3 eine Rolle [104]. Es handelt sich funktionell um spezifische Proteinasen, die das vom Fibroblasten sezernierte lösliche Prokollagen-Molekül durch posttranslationale Modifikation zu aktivieren vermögen und die Ausbildung der triple helikalen Kollagen-Monomere induzieren. LOX katalysiert dabei die Oxidation von einem Peptidyl Lysin eines Kollagen-Moleküls zu einem hochreaktiven Peptidyl Aldehyd (Abbildung 3). Dieses Produkt reguliert schließlich spontane inter- und intramolekulare kovalente Crosslinks zwischen den Ketten von Kollagen, indem es mit einer Kette eines noch unmodifizierten Peptidyl Lysins reagiert oder sich mit einem weiteren Peptidyl Aldehyd verbindet [63;72;95;119]. Die Tertiärstruktur der Fibrillen-formenden Kollagene erlaubt dabei die erforderliche Annäherung der Fibrillen (head-to-tail), um die Ausbildung der Crosslinks zu gewährleisten [121]. Die so entstandene Matrix stabilisiert das Parenchym sämtlicher Organe und lässt sich, durch Variation des Anteils der jeweiligen Bestandteile (Kollagen, Elastin), in ihrem Elastizitätsgrad den jeweiligen Anforderungen anpassen [68].

#### **2.3.2.2. Proteinbiosynthese**

Die Synthese von LOX erfolgt über ein Vorläuferpeptid, dessen genetische Informationen auf dem menschlichen Chromosom 5q23 codiert ist [57]. Abbildung 4 schematisiert die verschiedenen Stufen des Prozesses bis zur Generierung des funktionsfähigen Enzyms. Unmittelbar nach erfolgter Translation, wird das Produkt mit Hilfe eines Signalpeptids als Pre-Pro-LOX zum endoplasmatischen Retikulum der Zelle geschleust, wo es verschiedenen Umbauprozessen unterliegt bis es letztendlich seiner Funktion als Katalysator nachgehen kann. In einem ersten Schritt erfolgt die Hydrolyse des Signalpeptids. Anschließend wird das übrig gebliebene Propeptid glykosyliert und die Übertragung zweier Cofaktoren,  $\text{Cu}^{2+}$  und Lysin Tyrosylquinon (LTQ), realisiert [164]. Die Sekretion erfolgt dann als 50 kDa Propeptid in den Extrazellularraum, welches mittels N-Glykosylation durch die Procollagen C-Proteinase dort zum aktiven Metaboliten modifiziert wird. Es handelt sich dabei um das gleiche Enzym, welches auch für die Spaltung von Prokollagen zu Kollagen verantwortlich ist, was eine enge Korrelation der Stoffwechselwege von LOX und Kollagen vermuten lässt [30;113]. Die proteolytische Spaltung von ProLOX findet an der Oberfläche von Fibroblasten statt und unterliegt einer Komplexbildung mit Fibronektin, die zum einen eine Konformationsänderung

des Proenzym bewirkt, wodurch das aktive Zentrum zugänglicher gemacht wird, zum anderen die Procollagen-C-Proteinase in nähere Nachbarschaft zu ihrem Substrat bringt. Fibroblasten aus Knockout-Mäuse, deren Fibronektin-Biosynthese genetisch ausgeschaltet war, wiesen eine stark reduzierte proteolytische Aktivität bezüglich der Spaltung von ProLOX zu LOX auf [43]. Dies belegt die Bedeutsamkeit der Relation zwischen den beiden Molekülen.

Nach erfolgter extrazellulärer Aktivierung, eröffnen sich dem Enzym zwei Einsatzgebiete entsprechend ihrer räumlichen Separierung: Durch Translokation in intrazelluläre Kompartimente von Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen, vermag LOX Adhäsion, Zellmigration und Genregulation zu beeinflussen, sowie die Kontrolle von epithelialer zu mesenchymaler Transition zu übernehmen [97]. Neben seiner intrazellulären Lokalisationen, konnte man LOX auch außerhalb der Zellen ausmachen: so im Extrazellularraum von Haut-, Aorta-, Herz-, Lunge-, Leber- und Knorpelzellen [59;69;155]. Hier erfolgt auch die Stabilisierung der Kollagenmatrix durch das beschriebene Crosslinking, was bei LOX-Knockout-Mäusen etliche Pathologien hervorruft. So induziert das Fehlen des Enzyms, durch Destrukturierung der extrazellulären Matrix (Ruptur der interzellulären Verbindungen zwischen Gefäßmuskelzellen, Abhebung der Endothelzellen von der Basalmembran, etc.), Gefäßrupturen, Dissektionen und Aneurysmen [39;48;49;100;117;124;141].

Die Hypothese einer ätiologisch wirksamen Potenz von LOX in der Genese von Vorhofflimmern ergibt sich aus deren Induktionsvermögen für die extrazelluläre Substanzsteigerung. Ob und inwiefern das Enzym am strukturellen profibrotischen Remodeling bei Vorhofflimmern beteiligt ist, ist Inhalt der folgenden experimentellen Studie. Um eine etwaige Beteiligung von LOX am Signaltransduktionsweg bei der Genese von Vorhofflimmern zu eruieren, charakterisierten wir einen Regulationsmechanismus über CTGF mittels Zellkulturexperimenten in neonatalen Rattenkardiofibroblasten, sowie den Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die LOX-Expression in genetisch modifizierten Mäusen.

### **2.3.3. Transforming growth factor- $\beta$ : fibrogenetisches Zytokin**

Die TGF- $\beta$ -Superfamilie umfasst mehr als 30 Polypeptid-Signalmoleküle, deren Gemeinsamkeit sich vor allem auf ihr generelles Wirkprinzip konzentriert. Nach Produktion und anschließender Sekretion entfalten die Signalpeptide ihre meist auto- oder parakrinen Effekte durch Bindung an spezifische Glycoprotein-Transmembranrezeptoren, die nachfolgend mittels Aktivierung von SMAD-Proteinen die Gentranskriptionsmuster der Zelle beeinflussen. In Abhängigkeit des jeweiligen Botenstoffes erfolgt die Rekrutierung unterschiedlichster Rezeptorkombinationen, wobei jede Konstellation, durch Determination der nachfolgenden Signalübertragung, eine



andere Zellantwort induziert [33;76]. Das enorme Spektrum an Möglichkeiten ergibt die Vielfalt zellulärer Mechanismen. So etwa die Beteiligung an Zelldifferenzierung, Proliferation, Embryonalentwicklung, Immunmodulation, Apoptose, Adhäsion und Migration [11;96]. Diese Multifunktionalität der Zytokinfamilie lässt die Pathologien erraten, welche durch Fehler in der qualitativen wie quantitativen Syntheseleistung provoziert werden: Neben der Pathogenese von Atherosklerose, Diabetes, Organfibrose sowie der von hereditären hämorrhagischen Teleangiectasien, spielt der Mediator auch in der Karzinogenese und der Wundheilung eine Rolle. Da außerdem nahezu alle humanen Zellen TGF- $\beta$  synthetisieren können, ist seine Bedeutung in der Erforschung der Zellhomöostase des Organismus immens [122].

Das Zytokin TGF- $\beta$  existiert in drei Isoformen, welche sich vor allem in ihrem Expressionsort unterscheiden. Die im Bindegewebe vorherrschende Variante ist TGF- $\beta$ 1. Aktiviertes TGF- $\beta$ 1 setzt sich aus zwei identischen Untereinheiten zusammen, welche durch kovalente Bindung über Disulfidbrücken das metabolisch wirksame 25kDa Homodimer ergeben [101]. Paradoxe Weise bewirkt TGF- $\beta$ 1, abhängig vom Ursprung seiner jeweiligen Effektorzelle, zum Teil gegenteilige Resultate. So inhibiert das Zytokin beispielsweise in epithelialen, endothelialen und hämatopoetischen Zellen die Proliferation, während das Mesenchym deutlich stimuliert wird [18;84]. TGF- $\beta$ 1 gilt hier als potentestes profibrotisches Zytokin [11]. Die Pleiotropie des Botenstoffes richtet sich also nach der Beschaffenheit seiner Zielzelle, d.h. deren Typus, Entwicklungsstadium, Differenzierungsstatus und Zyklusposition [101]. In menschlichen Fibroblasten dermalen Ursprungs, sowie in humanen glatten Gefäßmuskulzellen, gilt TGF- $\beta$ 1 als Stimulus der extrazellulären Matrixsynthese und wirkungsvollster Aktivator der Kollagensynthese. Als endogener Signaltransduktor einer extrazellulären AngII-Stimulation über den AT1-Rezeptor, vermag TGF- $\beta$ 1 nämlich die Kollagenexpression der Zelle zu steigern [11;44;152]. Downstream von TGF- $\beta$ 1 lässt vor allem sein Vermögen, die Lysyl Oxidase zu regulieren, Rückschlüsse auf seine fibrogenetische Potenz zu [47;54;66;139]. Die Rolle von TGF- $\beta$  im atrialen Rhythmusgeschehen bleibt allerdings unvollständig geklärt.

#### **2.3.4. Fibronectin: Baustein einer fibroproliferativen Matrix**

Wegen seiner beschriebenen Interaktion sowohl mit LOX, als auch mit Kollagen, zog dieses 440kDa große Glykoprotein unser Interesse an der Charakterisierung seiner Beteiligung beim strukturellen Remodeling im Rahmen von Vorhofflimmern auf sich [43;162]. Durch das Eingehen von Bindungen mit Integrinen und Bausteinen der extrazellulären Matrix, entfaltet Fibronectin seine Wirkung als Modulator von Adhäsion, Migration, Differenzierung und Wachstum und spielt eine Rolle in der Genese von Krebs und Fibrose, sowie in dem Prozess der



Wundheilung [114;159]. Mittels alternativem Splicing der prä-mRNA ist es möglich aus dem einen Gen, welches für Fibronectin codiert, über 20 verschiedene Isoformen zu generieren [80]. Das Glykoprotein existiert als Dimer, dessen beide fast identische Polypeptidketten durch zwei Disulfidbrücken am C-terminalen Ende kovalent miteinander verbunden sind. Jedes Monomer lässt sich in drei Domänen unterteilen, welche sich durch den Aufbau der sich wiederholenden Sequenzen unterscheiden und sich dementsprechend in Typ I, II und III aufteilen lassen [145]. Dabei kommen jedem Typ unterschiedliche Aufgaben zu. Die Verantwortlichkeit von Typ II liegt unter anderem in der Präsentation der Kollagen-Bindungsstelle und kommt insgesamt zweimal im Fibronectin-Molekül vor [27]. Entsprechend der unterschiedlichen Löslichkeiten der verschiedenen Isoformen, lassen sich zwei Untergruppen bilden [114]:

1. Lösliches Plasma- Fibronectin, welches in den Hepatocyten synthetisiert wird.
2. Weniger lösliches zelluläres Fibronectin, welches, von Fibroblasten sezerniert wird. Dort akkumulieren die Dimere und lagern sich mit Hilfe von Integrinen zusammen. Letztendlich entsteht durch weitere Verzweigung ein Netz aus unlöslichen Fibronectin-Fibrillen, welches als Bestandteil der extrazellulären Matrix fungiert [168]. Die Affinität zellulären Fibronectins zur Lysyl Oxidase ist um ein Vielfaches höher als die der plasmatischen Form [43].

Uns interessierte die Bedeutung von Fibronectin für atriale Rhythmusstörungen und ob bzw. inwiefern Regulationsmechanismen diesbezüglich bestehen. Insbesondere seine enge Relation zu LOX und Kollagen lässt auf entscheidende ursächliche Assoziationen der drei Moleküle mit pathogenetischen Faktoren unter Vorhofflimmern spekulieren.

## 2.4. Eigene Fragestellung

Trotz der großen Bedeutung von atrialem strukturellem Remodeling für die Pathogenese von Vorhofflimmern ist der zugrundeliegende molekulare Mechanismus bislang nur teilweise bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung dieser zellulären Aberrationen bei atrialer Fibrosierung im Rahmen der Rhythmusstörung. Dabei wird insbesondere die Hypothese einer Regulation des atrialen strukturellen Remodelings bei Vorhofflimmern durch die Lysyl Oxidase getestet.

Daraus ergeben sich die folgende Problemstellungen:

1. Identifizierung von Molekülen die unter Vorhofflimmern einer Expressionsänderung unterliegen: Spielen LOX, TGF- $\beta$ 1 und Fibronectin eine Rolle im strukturellen Remodeling des Vorhofflimmerns?
2. Lokalisation im myokardialen Zellverband: Welcher Zelltypus spielt eine Rolle für die Aktivität der Lysyl Oxidase?
3. Charakterisierung der Interaktionen *in vitro*: Werden die identifizierten Gene durch Rac1 reguliert? Welche Auswirkungen haben eine AngII bzw. CTGF-Behandlung? Hat die Lysyl Oxidase Einfluss auf den Fibronectin-Metabolismus?
4. Verifizierung der Ergebnisse *in vivo*: Spielt die Rac1-GTPase auch eine kausale Rolle im strukturellen Remodeling bei Vorhofflimmern *in vivo*? Welchen Einfluss hat eine Überexpression von TGF- $\beta$ 1?
5. Krankheitsprävention und potentielle Therapieoptionen: Existieren bereits Interventionsmöglichkeiten zur Prophylaxe von atrialem strukturellem Remodeling? Lässt sich Vorhofflimmern dadurch beeinflussen?

## 3. Material und Methodik

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Antikörper

##### 3.1.1.1. Primärantikörper

Produkt	Hersteller
$\alpha$ -sarcomeric Actin, Mouse IgM	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rac1 (clone 23A8), Mouse IgG <sub>2b</sub>	Upstate cell signaling solutions, NY, USA
Vimentin, Mouse IgG	Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA
LOX, Rabbit IgG	Abcam, Cambridge, UK
TGF- $\beta$ 1 (D-12), Goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Fibronektin (IST-9), Mouse IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
$\beta$ -Tubulin (H-235), Rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
GAPDH (6C5) Mouse IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

##### 3.1.1.2. Sekundärantikörper

Produkt	Hersteller
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Konjugat	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Goat Anti-Rabbit IgG-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rabbit Anti-Goat IgG-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rhodamine (FITC)-conjugated Anti-Mouse IgG	Dianova, Hamburg
Rhodamine (FITC)-conjugated Anti-Mouse IgM	Dianova, Hamburg
Rhodamine (TRITC)-conjugated anti-rabbit IgG	Dianova, Hamburg

### 3.1.2. Primer

Produkt	Sequenz	Größe	Hersteller
<u>RT-PCR:</u>			
LOX human	for: TTACCCAGCCGACCAAGATA	399bp	MWG, Ebersberg
	rev: CTGAGGCATACGCATGATGT		MWG, Ebersberg
GAPDH human	for: ACCACAGTCCATGCCATCAC	523bp	MWG, Ebersberg
	rev: TCCACCACCCTGTTGCTGTA		MWG, Ebersberg
<u>Real time PCR:</u>			
Rac1mouse	for: AACCTGCCTGCTCATCAGTT	135bp	MWG, Ebersberg
	rev: TTGTCCAGCTGTGTCCCATA		MWG, Ebersberg
CTGF mouse	for: AGCAGCTGGGAGAACTGTGT	164bp	MWG, Ebersberg
	rev: GCTGCTTTGGAAGGACTCAC		MWG, Ebersberg
GAPDH mouse	for: CCCTGCATCCACTGGTGCTGC	292bp	MWG, Ebersberg
	rev: CATTGAGAGCAATGCCAGCCC		MWG, Ebersberg
TGF-β1human	for: GACTGCGGATCTCTGTGTCA	121bp	MWG, Ebersberg
	rev: GGGCAAAGGAATAGTGCAGA		MWG, Ebersberg
18S human	for: TTGATTAAGTCCCTGCCCTTTGT	68bp	MWG, Ebersberg
	rev: CGATCCGAGGGCCTCACTA		MWG, Ebersberg

### 3.1.3. Gele für Western Blot

Produkt	Zusammensetzung
SDS-Polyacrylamidgel 12%ig (Proteine < 30kDa)	- Sammelgel: 30% Acrylamid: 2ml; Sammel-Puffer 2,5%: 2.5ml; 10% SDS: 100 $\mu$ l; 10% APS: 50 $\mu$ l; TEMED: 10 $\mu$ l
	- Trenngel: 30% Acrylamid: 10 ml; Trenn-Puffer: 7,5 ml; 10% SDS: 300 $\mu$ l; Aqua dest.: 12 ml; 10% APS: 150 $\mu$ l; TEMED: 10 $\mu$ l
SDS-Polyacrylamidgel 12%ig (Proteine < 30kDa)	- Sammelgel: 30% Acrylamid: 2ml; Sammel-Puffer 2,5%: 2.5ml;

10% SDS: 100 µl; 10% APS: 50 µl; TEMED: 10 µl

- Trenngel:

30% Acrylamid: 12 ml; Trenn-Puffer: 7,5 ml; 10%

SDS: 300 µl; Aqua dest.: 10 ml; 10% APS: 150µl;

TEMED: 10µl

### 3.1.4. Gele für Polymerasekettenreaktion

Produkt	Zusammensetzung
Agarosegel 1,2 %	1,2 g Agarose; 100 ml 1×TAE-Puffer; 10µl Ethidiumbromid

### 3.1.5. Enzyme und Kits

Produkt	Hersteller
DC Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
DC Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
Kollagenase von Clostridium histolyticum	Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA
Pankreatin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Omniscript RT Kit 200	Qiagen, Hilden
PCR Kit	peqLab Biotechnologie, Erlangen
Platinum SYBR Green qPCR Mix-UDG	Invitrogen, Karlsruhe
RNAPure	peqLab Biotechnologie, Erlangen
RNasin (RNase Inhibitor)	Promega, Madison, WI, USA
Sircol Kollagen Assay Kit	Biocolor Ltd., Carrickfergus, Northern Ireland, UK
Transfektionskit	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

### 3.1.6. Medien, Lösungen und Puffer

Produkt	Zusammensetzung
ADS-Puffer	Aqua dest., 6,78 g/l NaCl, 4,76 g/l HEPES, 8 ml/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 g/l Glucose, 0,4 g/l KCl, 8 ml/l MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
DMEM-Nährmedium	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (+ Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; – Pyruvat), FKS (10 % [v/v]), Penicillin-Streptomycin (20 U/ml Penicillin G; 20 µg/ml), Gentamycinsulfat (0,08 mg/ml)
DMEM-Hungermedium	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (+ Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; – Pyruvat), Penicillin-Streptomycin (20 U/ml Penicillin G; 20 µg/ml), Gentamycinsulfat (0,08 mg/ml)
Elektrophoresepuffer	Penicillin G; 20 µg/ml), Gentamycinsulfat (0,08 mg/ml)
Enzym-Mix	Aqua dest., 144 mg/ml Glycin, 30,3 mg/ml Tris, 10 mg/ml SDS
F 10 Medium	ADS-Puffer, 0,6 mg/l Pankreatin, 0,5 mg/l Kollagenase F 10 Medium (Ham + Glutamin), Horse Serum (10 % [v/v]),
Protein-Ladepuffer	FKS (5 % [v/v]), Penicillin/Streptomycin (1 % [v/v]) Aqua dest., 5 ml 50 % Glycerol, 1,25 g 10 % SDS, 2,5 ml 0,625 M Tris, 125 µl/ml 1 M DTT
DNA-Ladepuffer	100 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerol, 1 µg/ml 100 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 0,72 µg/ml Aprotinin
Lysepuffer	5 % (1 %) Trockenmilch
5 % (1 %) Trockenmilch	PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 0,72 µg/ml Aprotinin
PBS-Puffer	5 g Trockenmilchpulver (1 g) in 100 ml PBS-Tween-Puffer Aqua dest., 80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 14,4 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,4 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
PBS-Tween-Puffer	Aqua dest., 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,24 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 ml/l Tween 20
SSC-Puffer	Aqua dest., 35,06 g/l NaCl, 17,95 g/l Natriumcitrat
Transferpuffer	Aqua dest., 200 ml/l Methanol, 14,5 mg/ml Glycin, 2,9 mg/ml Tris; pH 8,3
50 × TAE-Puffer	242g Tris; 57,1 ml Essigsäure; 100ml 0,5M EDTA pH 8,0; Aqua dest. Auf 1l auffüllen

### 3.1.7. Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Cover Glasses	VWR International, Darmstadt
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Carlsbad,
Falcon Cell Strainer (70 µm)	California,USA
High Performance autoradiography film	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
MicroAmp-96-Well-Reaktionsplatten	GE Healthcare, München
Nitrocellulose/Filter Paper Sandwiches, 0,2 µm	Applied Biosystems, Carlsbad,
	California,USA
P 6 Primera Zellkulturschalen	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Polysine beschichtete Objektträger	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
PP-Test-tubes (15 ml, 50 ml)	VWR International, Darmstadt
Cell Scraper	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Wägeschale	Sarstedt, Newton, USA
Zellkulturschale 100 mm	VWR International, Darmstadt
Zellkulturschale TC-plate 6 well	TPP, Trasadingen, Schweiz
	Greiner-bio.one, Frickenhausen

### 3.1.8. Chemikalien und sonstige Reagenzien

Produkt	Hersteller
Acrylamid Electrophoresis Purity Reagent 30%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Agarose	Lonza, Basel, Schweiz
Albumin bovin Fraction V (BSA) pH 7,0	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Angiotensin II	Sigma-Aldrich Chemie, München
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
BAPN	Sigma-Aldrich Chemie, München
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie, München
Connective Tissue Growth Factor (CTGF)	Biozol, Eching
Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

---

di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	VWR International, Darmstadt
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, München
EDTA (pH 8,0)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	VWR International, Darmstadt
F 10-Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Farbstoff Sirius RED F3BA	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Farbstoff Fast Green FCF	Appllichem GmbH, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Futtermittel	ssniff, Soest, Germany
Gentamycinsulfat	Merck, Darmstadt
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycin	VWR International, Darmstadt
HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperaziny-N'-2-ethanesulfonsäure)	Sigma-Aldrich Chemie, München
High range marker	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Horse Serum	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Immersion Oil	Cargille Laboratories, Inc., Cedar Grove, NJ, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenkarbonat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Low range marker	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Neonatal Calf Serum (NCS)	Invitrogen, Karlsruhe
NSC23766	Merck, Darmstadt
Paraffin	Leica Microsystems, Nussloch
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie, München

---



Pepsin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rosuvastatin (Crestor®)	AstraZeneca, London, UK
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Trockenmilchpulver	Scufin, Zeven
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	VWR International, Darmstadt
Triton	Sigma-Aldrich Chemie, München
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Vectashield Mounting Medium with Dapi	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Wasser, vollentsalzt und destilliert (Aqua. dest.)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Xylol	Merck, Darmstadt

### 3.1.9. Geräte

Produkt	Hersteller
Autoklaviergerät Tuttnauer 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Eismaschine Scotsman Frimont MF 22	Scotsman Frimont, Milano, Italien
Entwicklungsautomat Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Glas-Teflon-Potter	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Hamilton-Spritze	Hamilton Company, Reno, Nevada, USA
Magnetrührer Typ RCT	IKA Labortechnik, Staufen i. Br.
Metallblockthermostat HTMR-133	HLC Biotech, Bovenden, Deutschland
Mikroskope:	
Nikon Eclipse E600	Nikon GmbH, Düsseldorf
Olympus CK 2 Inverted phase contrast	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mikrotom	Leica Microsystems, Nussloch
Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini-Protean Gelgießstand	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Nikon Digital Camera DXM1200F	Nikon GmbH, Düsseldorf
pH-Meter 526	WTW GmbH, Weilheim
Spectrophotometer DU 730	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA

Pipetterhilfe Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Pac 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Röntgenkassette 24 x 30 cm	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Scanner CanoScan 5000F	Canon Deutschland, Krefeld
Schüttel- und Mischgerät Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelwasserbad Typ 1086	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwendel
Stickstoffbehälter GT 140	Air Liquide, Düsseldorf
Stickstofftank Apollo 50	Messer Griesheim, Krefeld
Taq-Man System	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Vortexer VV3	VWR International, Darmstadt
Waagen:	
VIC-Series 0.01g Precision Balances	Acculab UK, Edgewood, NY
ALC-Series 0.0001g Analytical Balances	Acculab UK, Edgewood, NY
Überkopfschüttler REAX 2	Heidolph Instruments, Schwabach
Zellkulturgeräte:	
Heracell 150 Cell Culture Incubator	Heraeus Holding, Hanau
Sicherheitswerkbank Heraeus KS 12	Heraeus Holding, Hanau
Sicherheitswerkbank Heraeus HS 12	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifugen:	
Biofuge pico	Heidolph Instruments, Schwabach
Megafuge 1,0	Heraeus Holding, Hanau

### 3.1.10. Software

Produkt	Hersteller
LabWorks 4.6	UVP, Upland, CA, USA
Lucia G, Version 4.81	Laboratory Imaging, Praha, CZ
Sigma Stat-Software, Version 2.0	Systat Software GmbH, Erkrath
XnView	Pierre-Emmanuel Gougelet, Reims, Frankreich

## 3.2. Materialgewinnung

### 3.2.1. Zellkultur

#### 3.2.1.1. Isolierung neonataler kardialer Rattenfibroblasten

Zwischen dem zweiten und fünften Tag post partum erfolgte die Wurfentnahme aus dem Zuchtbestand von Sprague Dawley Ratten zur kardialen Zellisolation. Die sterile Präparation unter Zellkulturbedingungen begann mit der Dekaptierung der neonatalen Tiere. Es erfolgte eine kurze 70 %ige Ethanolspülung des Körpers mit anschließender Thoraxeröffnung links paramedian. Um das Risiko einer bakteriellen Kontamination zu minimieren, galt es Verletzungen des Gastrointestinaltraktes hierbei zu vermeiden. Eine sanfte transthorakale Massage provozierte die Verlagerung des Herzens in die obere Thoraxapertur und ermöglichte so den kardialen Zugang. Im Folgenden wurden die Gefäßverbindungen des Herzens durchtrennt und das Organ in einer zuvor mit ADS-Puffer vorbereiteten 100 mm Zellkulturschale aufgefangen. Die Präzisierung der weiteren Präparation diente der Separation von Parenchym und perikardialen Gewebe mit Entfernung von Gefäßstümpfen. Dabei erlaubte die geringe Größe des Herzens leider kaum den Erhalt des Vorhofmyokards. Das somit erhaltene Ventrikelpreparat wurde in eine mit frischem ADS-Puffer gefüllte Zellkulturschale gegeben und in ca. 15 gleich große Stücke zerteilt. Der ADS-Puffer wurde nun durch 10ml Enzym-Mix ersetzt und die Gewebesuspension unter mehrmaliger Resuspendierung in eine sterile Flasche überführt. Zur Effektoptimierung wurde das Gewebelysat nun für fünf Minuten bei 37° C in einem Schüttelwasserbad mit 80-100 U/min inkubiert. Hierbei bildete sich ein Überstand (Verdau), welcher, ohne Mitnahme von Gewebestücken, mit einer Pipette entfernt und verworfen wurde. Es erfolgte eine erneute Applikation von 10 ml Enzym-Mix mit anschließender Inkubation der Suspension für 20 Minuten im Schüttelwasserbad. Der Ablauf der Inkubationszeit initiierte die Überführung des Überstandes in ein steriles 50 ml Test-tube-Gefäß, wo die Enzymaktivität unter Zugabe von 2 ml Neonatal Calf Serum (NCS) gestoppt wurde. Mittels Zentrifugation bei 700 U/min für fünf Minuten, konnten die enthaltenen Zellen von der Lösung getrennt werden. Diese wurde entfernt und das Pellet durch vorsichtiges Schütteln in 4 ml zugesetztem NCS gelöst. Die weitere fünfmalige Repetition dieser Prozedur unterschied sich lediglich anhand der jeweiligen Verdau-Zeiten: 25 min.; 25 min.; 15 min.; 10 min.; 10 min. Die somit erworbenen sechs Suspensionen wurden in einem neuen 50 ml Test-tube-Gefäß gesammelt und anschließend zentrifugiert. Diese abschließende Zentrifugation (700 U/min, fünf Minuten) brachte die gesamte Zellausbeute der Isolation hervor, nachdem der Überstand verworfen wurde. Das Zellzentrifugat wurde im weiteren Verlauf in 4 ml F10-Medium durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert und in einen Falcon Cell Strainer (70 µm)

filtriert. Die Filterspülung vor und nach Filtration mit je 1 ml F 10 Medium führte zum Erhalt von 6 ml Zellsuspension. Dieses Lysat wurde nun auf zwei 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 60 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, wobei mikroskopisch die Adhäsion der Fibroblasten am Schalenboden kontrolliert wurde. Anschließend wurde das Medium mit den darin enthaltenen Kardiomyozyten abgenommen und in ein 50 ml Test-tube-Gefäß überführt, um auch diese Zellen weiteren Versuchsreihen zuzuführen. Die p0-Generation der Fibroblasten wurde in F 10-Medium in einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C inkubiert.

### **3.2.1.2. Kultivierung neonataler kardialer Rattenfibroblasten**

Nach zwei Tagen war eine etwa 90%ige Zellkonfluenz erreicht, was eine Aufspaltung der Fibroblasten auf mehrere Zellkulturschalen (100 mm Zellkulturschale oder TC-plate 6 well) bedingte. Das ab dieser Passage (p1) verwendete Medium, DMEM-Nährmedium, wurde unter sterilen Bedingungen und vorheriger mikroskopischer Vitalitäts- und Kontaminationskontrolle der Zellen alle zwei Tage gewechselt. Die Toleranzgrenze des Zelllinienwachstums wurde auf die Ausbildung eines konfluenten Zellrasens determiniert. Je nach Entwicklungsstand erfolgte somit etwa alle fünf Tage eine Subkultivierung durch Trypsinierung (0,25 % Trypsin in PBS-Puffer). Ziel war der Erhalt des blastären Zustandes; eine weitere Differenzierung zu Fibrozyten war zu vermeiden. Nachdem die Kultivierung der Zellen schließlich die Ausbildung eines ca. 80%ig konfluenten Zellrasens mit ausreichend hoher Anzahl an Zellkulturschalen für die anschließenden Behandlungen erreichte, wurde das Nährmedium abgesaugt und durch DMEM-Hungermedium ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 12-24 Std erfolgte die Zugabe verschiedener Substanzen in das DMEM-Hungermedium mit anschließender Inkubation. Angaben zu Dosis und Zeit der Behandlungen werden an entsprechender Stelle weiter unten gemacht.

Die Reaktion der neonatalen kardialen Fibroblasten wurde durch Waschung mit autoklaviertem 1×PBS gestoppt, was gleichzeitig die Zellernte einleitete. Nach Applikation von 100 µl eines hypotonen Lysepuffers wurde der Zellverband und dessen Anheftung an den Kulturschalen, unter Zuhilfenahme eines Schabers, aufgelöst, Zellbestandteile liberiert und in Eppendorfgefäße überführt. Die anschließende Erhitzung des gewonnenen Gesamtllysats auf 95° C für vier Min garantierte die Denaturierung der Proteine. Im weiteren Verlauf wurde zunächst die Bestimmung der Gesamtproteinmenge und folgend eine quantitative Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot durchgeführt. Die verbliebene Zellprobe wurde bei -20°C eingefroren.

### 3.2.1.3. Behandlung neonataler kardialer Rattenfibroblasten

Um die zelluläre Antwort auf äußere Reize zu detektieren, wurden die Fibroblasten, nach Inkubation mit dem DMEM-Hungermedium, dem entsprechenden Agens ausgesetzt. Konzentration und Dauer dieser Provokation waren dabei abhängig von der jeweiligen Substanz:

**Tabelle 1: Behandlungen**

	Konzentration	Dauer
AngII	1 $\mu$ M	3 Std.
NSC	100nM	21 Std.
CTGF	1ng/ml	1 Std.
BAPN	100nM	21 Std.

### 3.2.2. Humane linksatriale Appendices

Mitralklappenoperationsbedürftige Patienten stellten die Quelle der Gewebeproben aus humanen linksatrialen Appendices dar, die freundlicherweise von Prof. Schäfers, Universität des Saarlandes, zur Verfügung gestellt wurden [1]. Eine präoperative elektrokardiographische Einteilung dieser Patienten erfolgte, als Grundlage der späteren Versuchsreihe, in Sinusrhythmus oder permanentes Vorhofflimmern, wobei sich die Definition von permanentem Vorhofflimmern auf eine Dokumentation der Rhythmusstörung über mehr als sechs Monate bezog. Schließlich wurden beide Gruppen bezüglich ihres Vorhofdurchmessers, ihrer linksventrikulären Funktion und ihrer Medikation gepaart. Die präoperativen Konditionen für alle Patienten beliefen sich auf einen medikamentösen Verzicht für mindestens zwölf Stunden und eine standardisierte Echokardiographie. Die entsprechenden detaillierten Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 2 dargestellt.

Zur Konservierung wurde das perioperativ entnommene Gewebe schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Tabelle 2: Patienten-Charakteristika

	<b>SR</b>	<b>SEM</b>	<b>AF</b>	<b>SEM</b>	<b>P</b>
<b>n =</b>	10		10		
<b>männlich (weiblich)</b>	5(5)		5(5)		
<b>Alter [Jahre]</b>	66,0	6,6	72,0	2,5	ns
<b>Größe [cm]</b>	163	4,6	174	2,7	ns
<b>Gewicht [kg]</b>	82	3,2	85,0	4,2	ns
<b>LA [mm]</b>	53,2	2,4	54,2	5,2	ns
<b>LVEF [%]</b>	54,6	9,2	58,7	3,4	ns
<b>LVESd [mm]</b>	41,5	5,2	40,6	8,3	ns
<b>LVEDd [mm]</b>	56,7	4,7	54,7	3,2	ns
<b>IVSd [mm]</b>	12,0	1,0	12,1	0,9	ns
<b>LVPWd [mm]</b>	12,5	1,2	11,8	1,5	ns
<b>Beta-Blocker</b>	7		7		
<b>ACE-/ AT<sub>I</sub>-Hemmer</b>	8		8		
<b>Aldosteron-Antagonisten</b>	1		1		
<b>Kalzium-Antagonisten</b>	1		1		
<b>Diuretika</b>	7		10		
<b>Nitrate</b>	0		1		
<b>Digitalis</b>	0		2		
<b>Amiodaron</b>	0		0		
<b>Sotalol</b>	0		0		
<b>Statin</b>	0		0		

ACE = Angiotensin Converting Enzyme, AT<sub>I</sub> = Angiotensin II-Rezeptor Typ 1, KHK = koronare Herzkrankheit, FS = Fraction of Shortening (Verkürzungsfraction), IVSd = interventrikuläre Septumdicke, LA = linker Vorhof, LVEDd = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, LVESd = linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser.

Die folgenden Quantifizierungsanalysen begannen mit der Gewebekomogenisierung durch Applikation von hypotonem Lysepuffer und Präparationsmittels eines Glas-Teflon-Potters. Nach anschließender Zentrifugation des Gewebelysats für eine Minute bei 2000 U/min, konnte der Überstand zur weiteren Verwendung gewonnen werden. Neben einer Proteinbestimmung nach Lowry und anschließender Western Blot-Analyse, wurde das Material auch für eine Polymerase-Kettenreaktion herangezogen.

### **3.2.3. Versuchstiere**

#### **3.2.3.1. Transgene Mäuse mit kardialer Rac1-Überexpression (RacET)**

Diese transgenen Mäuse zeichnen sich durch kardiale Überexpression an konstitutiv aktivem (V12) Rac1 unter Kontrolle des alpha-myosin heavy chain (MHC)-Promotors (RacET) aus. Sie entstammen der Anzucht von Mark A. Sussmann (San Diego State University, SDSU Heart Institute and Department of Biology, San Diego, CA, USA), welcher die Merkmale der Tiere charakterisierte [150]. Als Kontrolle bewährten sich FVBN-Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld), die wir als Wildtyp (WT) betitelten. Entsprechend ihrer Zuordnung in Fall- und Kontrollgruppe, wurden die Mäuse mit herkömmlichem Futter (ssniff) mit oder ohne den Zusatz von 0,4 mg Rosuvastatin pro Tag gefüttert. Die Auswahl von Rosuvastatin begründete sich in den erfolgreichen vorausgegangenen Mausexperimenten mit diesem Medikament [1;2]. Das transthorakale elektrokardiographische Monitoring aller Mäuse am Vortag und am Tag der Tötung detektierte Herzfrequenz, Herzrhythmus und die Existenz von P-Wellen. Lungen- und Leberperfusion wurden definiert als Feuchtgewicht minus Trockengewicht. Die Charakteristika der Tiere sind in Tabelle 3 im Detail dargestellt.

Die Tötung der Mäuse erfolgte im Alter von zehn Monaten. Im Anschluss wurde ein kleiner parenchymatöser Gewebeanteil aus dem linken Ventrikel entnommen, in hypotonem Lysepuffer suspendiert und schließlich mit Hilfe eines Glas-Teflon-Potters vollständig homogenisiert. Aus dem gewonnenen Lysat erfolgte die Anfertigung einer Proteinbestimmung nach Lowry und diverse Western Blot-Analysen.

Tabelle 3: Charakteristika von WT-, RacET 10- und RacET 10 + Statin-Mäuse.

	WT	SEM	RacET 10	SEM	RacET 10 + Statin	SEM	P
<b>Herzfrequenz [Schläge/Minute]</b>	216,0	5,1	243,3	24,9	247,0	20,3	ns
<b>Maus [g]</b>	23,1	0,4	39,6	1,5	34,6	2,5	<0,001/ns/0,001
<b>Tibia [mm]</b>	16,8	0,2	18,2	0,3	17,2	0,1	<0,001/0,003/ns
<b>Herz [mg]</b>	131,0	14,0	238,1	17,4	224,3	22,4	<0,001/ns/0,001
<b>Vorhof [mg]</b>	10,3	1,0	19,4	1,3	17,4	2,5	<0,001/ns/0,007
<b>LV [mg]</b>	92,6	11,6	165,7	14,4	153,1	16,4	0,001/ns/0,006
<b>RV [mg]</b>	15,1	1,2	26,3	1,6	25,1	2,7	0,001/ns/0,001
<b>Lungenwasser [µl]</b>	151,0	15,7	164,3	23,4	175,8	7,8	ns
<b>Leberwasser [µl]</b>	751,4	113,3	1686,2	324,7	1342,0	73,4	0,003/ns/0,049
<b>Herz[mg]/Tibia[mm]</b>	7,7	0,7	14,3	1,5	13,4	1,3	0,001/ns/0,003
<b>Vorhof[mg]/Tibia[mm]</b>	0,6	0,0	1,0	0,1	1,0	0,1	ns
<b>Vorhof[mg]/Herz[mg]/ Tibia[mm]</b>	4,6	0,2	4,5	0,3	4,5	0,5	ns

Wild-Typ Mäuse (WT) wurden mit zehn Monate alten RacET (RacET 10) und mit RacET 10 + Statin-Mäusen verglichen, die für zehn Monate mit 0,4 mg Rosuvastatin pro Tag behandelt wurden. n = 9. LV = linker Ventrikel, RV = rechter Ventrikel

### 3.2.3.2. Transgene Mäuse mit TGF-β1-Überexpression

Das linksventrikuläre Myokard TGF-β1 überexprimierender Alb/TGF-β1 (Cys<sup>223,225</sup>Ser)-transgener Mäuse diente der Charakterisierung und Präzisierung eines potenziellen Einflusses einer endogenen TGF-β1-Stimulation auf die myokardialen Geschehnisse der Molekularbiologie, insbesondere im Hinblick auf atriales Remodeling.



Die Überlassung der murinen Myokardproben erfolgte durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. S. Rosenkranz (Universität Köln), während die Konzipierung des Alb/TGF- $\beta$ 1 (Cys<sup>223,225</sup>Ser)-transgenen Mäuse-Modells auf Dr. N. Sanderson und Dr. S. S. Thorgeirsson (National Cancer Institute, NIH, Bethesda/MD/USA) zurückzuführen ist.

Das Alb/TGF- $\beta$ 1 (Cys<sup>223,225</sup>Ser)-Transgen existiert als 4,7kbp-Fusionsgen, welches sich aus den regulatorischen Elementen des murinen Albumin-Gens (Enhancer und Promotor), einem modifizierten Schweine-TGF- $\beta$ 1-cDNA-Fragment (1,5kbp) und der 3'-Region des humanen Wachstumshormon-Gens (625bp) zusammensetzt. Es entsteht durch Mikroinjektion des porcinen TGF- $\beta$ 1-cDNA-Fragmentes in die befruchteten Eizellen von F1-Mäusen (C57BL/6J  $\times$  CBA; Jackson Laboratories, Bar Harbor/ME/USA). Vor Vollzug der Insertion in das Fusionsgen wird an den Positionen 223 und 225 der Aminosäuren-Sequenz (Pro-Region der inaktiven Prä-Pro-Form von TGF- $\beta$ 1) dieses Fragments jeweils Cystein durch Serin substituiert. Dies bewirkt in der phänotypischen Ausprägung eine bevorzugte Sekretion der aktiven Form von TGF- $\beta$ 1 [132]. So erreicht die Transgen-Expression der modifizierten Mäuse in der Leber eine mehr als 10-fache Steigerung mit entsprechendem Anstieg der TGF- $\beta$ 1-Konzentration, sowie eine 7-fache Erhöhung der TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Myokard gegenüber gleichaltrigen Kontrollmäusen auf [137].

Nach Spülung und Gewichtsbestimmung der tiefgefrorenen Herzen wurde das perikardiale Gewebe mit einem Skalpell abgetrennt und verworfen. Anschließend erfolgte die Separierung des Herzens in einen rechtsventrikulären und einen linksventrikulären Anteil. Das linksventrikuläre Parenchym wurde, entsprechend der im weiteren Verlauf stattfindenden Analysen, in eine Fraktion zur Homogenat-Präparation (für Proteine) und eine Fraktion zur Nukleinsäure-Präparation (für RNA) aufgeteilt. Die vorläufige Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C. Die Homogenisierung für die Western Blot-Analysen wurde auch hier durch Zugabe eines hypotonen Lysespuffers und einem Glas-Teflon-Potter erreicht.

### 3.3. siRNA-Transfektion

Um die Assoziation von CTGF und der LOX-Expressionssteigerung in den kardialen Rattenfibroblasten zu kausalisieren, erfolgte eine CTGF-Synthesehemmung in diesen Zellen. Die praktische Umsetzung wurde entsprechend den Herstellerangaben des Reaktionskits, durch eine siRNA (small interfering RNA) Transfektion erreicht, in deren Verlauf eine mRNA-Zielsequenz spezifisch degradiert wird (=Silencing), um die Inhibition des entsprechenden Proteins zu provozieren. Wir nutzten also CTGF-spezifische Sequenzen (CTGF siRNA; sc-

39330, Santa Cruz; USA) in der Fallgruppe, sowie unspezifische Fluoreszin-konjugierte siRNA (scrambled RNA; sc-36869) zur Kontrolle.

Zu Beginn erfolgte die Herstellung des Transfektions-Mixes für die jeweiligen Fall- und Kontrollproben. Während die Lösung für die KontrollsiRNA 12  $\mu$ l KontrollsiRNA, 12  $\mu$ l Transfektionsreagenz und 1200  $\mu$ l Transfektionsmedium enthielt, setzte sich diejenige für die CTGFsiRNA aus 48  $\mu$ l CTGFsiRNA, 48  $\mu$ l Transfektionsreagenz und 1200  $\mu$ l Transfektionsmedium zusammen. Diese Stocklösungen wurden, nach 30-minütiger Inkubation in Dunkelheit, auf 4,8 ml Volumen, mittels Zugabe von Transfektionsmedium, aufgefüllt und resuspendiert. Konfluente Zellen wurden anschließend mit 1 ml Transfektionsmedium gewaschen und mit jeweils 800  $\mu$ l der entsprechenden Stocklösung pro Well für 7 Std. inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektions-Mix abpipettiert und die Zellen für 18 bis 24 Std. mit je 2 ml Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM) bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Im Anschluss wurden sie gehungert und für 3Std. mit 1 $\mu$ M AngII behandelt, mit 40  $\mu$ l Lysepuffer geerntet und der Auswertung mittels Western Blot Analyse zugeführt.

### 3.4. Proteinexpression und Western Blot

Die Western Blot-Analyse ist ein Verfahren der Proteinquantifizierung, bei dem gewonnenes Gesamtprotein aus Zelllysaten gelelektrophoretisch aufgetrennt wird, um die enthaltenen Proteine gemäß ihres, durch Molekulargröße, Nettoladung und Konformation determinierten, Wanderungsverhaltens im elektrischen Feld zu separieren.

Zunächst erfolgt eine Auftrennung der Proteine im Rahmen einer SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese). Entscheidend hierfür ist die Zusammensetzung des Trägermediums. Die Polyacrylamid-Gele bestimmen anhand ihrer Porengröße die spätere Trennschärfe. Somit muss, durch Variation des Gel-Vernetzungsgrades, eine Anpassung der Gel-Dimension an die Proteingrößen erfolgen (8%ige Gele für Proteine MG > 70 kDa, 10%ige Gele für Proteine mit einem MG von 40-70 kDa, 12%ige Gele für Proteine mit einem MG < 40 kDa). Nach Einbringen der Proteine in wässrige Lösung, werden diese mit SDS versetzt, welches ebenfalls ein Bestandteil des Gels darstellt und dessen anionische Gruppen den einzelnen Proteinen eine nach außen negative Ladung verleihen. Außerdem gehen die Fettsäureanteile von SDS Bindungen mit hydrophoben Proteinregionen ein und minimieren so unspezifische Interaktionen. Der Gebrauch von Mercapto-Ethanol in den Gelen begründet sich in dessen Vermögen zur Destruktion von Protein-Komplexen und solchen Proteinkonformationen, welche durch Disulfidbrückenbindungen stabilisiert werden. Resultat

ist die Präsentation der negativ geladenen Einzelkomponenten, welche, bei Anlage der Elektrophorese, im elektrischen Feld in Richtung Anode wandern. Die Separation wird durch das jeweils variierende Molekulargewicht der Proteine gewährleistet, welche im weiteren Verlauf auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden (=Blot, Abklatsch). Die optische Darstellung erfolgt schließlich durch zweifache Antikörperapplikation. Neben einem spezifischen, gegen das gesuchte Protein gerichteten Antikörper, wird in einem zweiten Schritt ein Peroxidase-konjugierter Antikörper zugegeben, der an den ersten bindet. Nach jeweiligem Abwaschen der ungebundenen Antikörperfragmente, wird der Membran ein Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt. Dieser beginnt in Folge der Katalyse durch die Peroxidase zu fluoreszieren und wird mit mittels Röntgenfilm sichtbar gemacht. Das Protein von Interesse kann so, anhand seines spezifischen Bandenmusters, identifiziert und das Signal durch Densitometrie quantifiziert werden.

#### **3.4.1. Proteinbestimmung nach Lowry**

Die Methode nach Lowry dient als grundlegendes Prinzip für Proteinbestimmungen [94]. Hierbei handelt es sich um ein zweifach kolorimetrisches Verfahren, in dessen Rahmen zunächst ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet wird (Bio-Rad, D<sub>c</sub> Protein Assay Reagent A), welcher im Folgenden ein appliziertes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Bio-Rad, D<sub>c</sub> Protein Assay Reagent B) reduziert. Die Proteinkonzentration der Lösung ist dabei proportional zu der Intensität ihrer Blaufärbung. Die photometrische Messung erfolgt schließlich bei 540 nm, wobei Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 100 - 1000 µg/ml als Standard dient.

Beginnend mit der jeweiligen Probenverdünnung im Verhältnis 2:20 mit Aqua destillata (2µl Probe + 18µl Aq. d.), wurde die Lösung anschließend in zwei Schritten zunächst mit 100µl Reagens A, dann mit 800µl Reagens B versetzt und gevortext. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 15 min bei RT, wurde die Absorption der Ansätze bei 540nm gegen einen Leerwert, bestehend aus 20µl Aq.d., 100µl Reagens A und 800µl Reagens B, photometrisch gemessen. Um eventuelle Schwankungen der Proteinkonzentration herauszumitteln, wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### 3.4.2. Gelelektrophorese

Die Aushärtung der SDS-Polyacrylamid-Gele erfolgte mit Hilfe von Glasplatten und Spacern, sodass die erreichten Dimensionen einheitlich bei  $16\text{cm} \times 16\text{cm} \times 1,5\text{mm}$  mit 10 Spuren lagen. Um eine quantitative Proteinäquivalenz der Spuren zu gewährleisten, dienten die ermittelten Proteinkonzentrationen als Berechnungsgrundlage für die Determination der entsprechenden Ladevolumina. Falls nicht anders angegeben wurden schließlich jeweils  $100\text{ }\mu\text{g}$  des Gesamtlisat auf ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel geladen und mit einer äquivalenten Menge Ladepuffer versetzt ( $5\text{ }\mu\text{l}$  Mercapto-Ethanol pro  $100\text{ }\mu\text{l}$  Probenpuffer). Danach wurden die Ansätze gevortext, zentrifugiert und für 7min bei  $70^{\circ}\text{C}$  thermisch behandelt, wodurch eine Denaturierung der enthaltenen Proteine garantiert wurde. Mittels einer Hamilton-Spritze konnten die präparierten Ansätze anschließend in Unterlegetechnik auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden. Zur späteren Bandenidentifizierung erfolgte die Applikation eines gültigen Markers parallel zu den Proben (High Range Marker mit MG-Standardbereich von 36-205kDa oder Low Range Marker mit MG-Standardbereich von 6,5-66kDa). Nach Anlegen des elektrischen Feldes mit einer Stromstärke von 30mA und der Applikation einer ausreichenden Menge Elektrophoresepuffers, begann die elektrophoretische Auftrennung bis nach ca. 150min die maximale Selektivität des Gels erreicht war.

### 3.4.3. Proteintransfer

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Proteine, war deren Übertragung aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran indiziert. Die Verwendung eines Transferpuffers und Filtern erlaubte die Realisation im Semi-Dry-Blotting-Verfahren mit der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell von Biorad.

Die Nitrozellulose-Membran wurde, in Abhängigkeit des Molekulargewichts des zu charakterisierenden Proteins, nach 45-60min bei 200mA aus dem elektrischen Feld entfernt und für circa 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer 5%igen Milchpulver/Ampuwa-Lösung belassen, um freie Oberflächen-Bindungsstellen zu blocken.

### 3.4.4. Antikörperinkubation

Zur Quantifizierung der Proteine auf ihrem Trägermaterial, wurden die Nylonmembranen anschließend mit einem spezifischen Antikörper für eine Nacht bei 4 °C dynamisch inkubiert. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von mindestens 12 Std. erfolgte eine Membranwäsche mit PBS-Tween-Puffer, um die nichtgebundenen Antikörperfragmente zu entfernen. Ein zweiter, Peroxidase-konjugierter Antikörper gegen Proteinstrukturen des Primärantikörpers wurde appliziert und die Membranen für 30 Minuten bei Raumtemperatur dynamisch inkubiert. Wieder wurden die ungebundenen Fragmente im Anschluss an die Komplexbildung mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen. Die Proteinbanden von Interesse lagen nun in zweifach antikörpergebundener Form vor, wodurch eine optische Darstellung mittels eines ECL-Kit ermöglicht wurde. Gemäß den Herstellerangaben, konnten die nachzuweisenden Banden auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht und densitometrisch quantifiziert werden. Eine Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenz-Reaktion determiniert hierbei nämlich eine Röntgenfilmschwärzung im Bereich der Antikörper-markierten Banden, deren Intensität proportional zum Proteingehalt ist. Zur Entwicklung der Filme in der Dunkelkammer wurden schließlich ein Curix-Entwicklersystem und AGFA-Reagenzien herangezogen.

**Tabelle 4: Antikörperverdünnungen Primärantikörper**

	<b>Konzentration</b>	<b>Dauer</b>	<b>Gel</b>	<b>Proteinmenge</b>
<b>LOX</b>	2 µg/ml	eine Nacht	10%ig	100 µg
<b>Rac1</b>	1:3000	eine Nacht	12%ig	100 µg
<b>TGF-β1</b>	1:250	eine Nacht	12%ig	100 µg
<b>Fibronectin</b>	1:500	eine Nacht	8 %ig	200 µg
<b>Tubulin</b>	1:500	eine Nacht	entsprechend	entsprechend
<b>GAPDH</b>	1:10000	eine Nacht	entsprechend	entsprechend

**Tabelle 5: Antikörperverdünnungen Sekundärantikörper**

	Konzentration	Dauer
Anti-mouse	1:5000	30 min
Anti-rabbit	1:4000	20 min

### 3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Als mRNA-Quantitätsanalyse erlaubt die Polymerease-Ketten-Reaktion die Detektion der Transkriptionsraten, durch spezifische Oligonukleotide (=Primer) definierter, linearer Genabschnitte. Dabei wird in einem ersten Schritt zuvor isolierte RNA, unter Einsatz des Enzyms „Reverse Transkriptase“, in die komplementäre DNA-Sequenz umgeschrieben. Dieses cDNA-Syntheseprodukt wird anschließend durch kontrolliertes Erhitzen zunächst aufgetrennt und dient dann in der folgenden Polymerasesynthesereaktion als Matrize für die spezifischen Oligonukleotide, deren Anlagerung an den DNA-Einzelstrang die Katalyseaktivität thermostabiler DNA-Polymerasen ermöglicht. Der Gebrauch der Primer im Überschuss ermöglicht multiple Reproduktionen des entstandenen doppelsträngigen Hybridisierungsproduktes. Durch zyklisches Erhitzen und Abkühlen der Reaktion lässt sich dieser Vorgang somit mehrfach wiederholen, resultierend in der exponentiellen Genese neuer sequenzidentischer DNA- Fragmente mit anschließender quantitativer Messung.

#### 3.5.1. RNA-Isolation

Als Voraussetzung für die Anwendung einer PCR gilt die Erfassung der mRNA-Expressionen in den jeweiligen Proben. Hierzu wird zunächst die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Beginnend mit der präparierbesteckassitierten Entnahme von 20-25 mg Gewebe aus den entsprechenden Proben (linke humane Herzohren, sowie TGF- $\beta$ 1-Mäuse), erfolgt die Materialgewinnung im Weiteren unter Applikation von je 1ml RNA-Isolutionslösung. Die angestrebte Homogenisierung der Präparate konnte mit einem Glas-Teflon-Potter erzielt werden. Die Zugabe von 300  $\mu$ l Chloroform, vortexen, Inkubation für 10min bei Raumtemperatur und anschließende Zentrifugation mit 14 000 U/min bei 4°C für 30min

bewirkte eine Separation der gelösten Moleküle, die sich in einer makroskopisch sichtbaren Phasentrennung wiederspiegelte. Eine obere wässrige Phase (RNA) war deutlich von einer basalen sedimentären Phase (DNA und Proteine) abzugrenzen. Die wässrige Phase wurde zur weiteren Aufbereitung in ein frisches Eppendorfgefäß abpipettiert und durch Isopropanolpräzipitation (15 min bei 4°C) konzentriert (Verhältnis 1:1). Nach einer Inkubationszeit für 60 min bei -20°C und anschließender erneuter Zentrifugation für 60 min bei 4°C mit 14 000 U/min, wurde die Reaktion durch Verwerfen des Überstand aus Isopropanol gestoppt. Eine zweimalige Waschung des verbliebenen Pellets mit 75%igem Ethanol, Vortexen und Zentrifugation (15 min, 14 000 U/min, 4°C) gewährleistete einen ausreichenden Reinheitsgrad des RNA-Konzentrats. Es folgte die Trocknung des Pellets bis zum Farbumschlag von milchig-weiß zu glasig-farblos. Eine abschließende Resuspension für 3min in 20µl DEPC-H<sub>2</sub>O, Inkubation von 5 min bei 65°C und erneuter Zentrifugation ermöglichten die strukturerhaltende Lagerung der RNA-Isolate bei -20°C gelagert.

### **3.5.2. Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die RNA-Isolate wurden auf Eis aufgetaut und eine Dilution mit Ampuwa im Verhältnis 1:50 hergestellt (1µl RNA-Isolat + 49µl Ampuwa).

Zur Quantifizierung der Gesamt-RNA diente ein Spectrophotometer, dessen UV-Licht die Absorptionen der Ansätze bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gegen einen Leerwert (200µl Ampuwa) misst. Der Quotient 260/280 nm gibt Hinweise auf den Reinheitsgrad der isolierten RNA, da die 260 nm Wellenlänge den RNA- oder DNA- Gehalt der Probe misst, während das 280 nm Licht insbesondere von kontaminierten Proteinen absorbiert wird. Zielführend ist ein Wert von 1,8 bis 2,0. Um eventuelle Schwankungen der RNA-Konzentration herauszumitteln, erfolgte die Durchführung unter Berücksichtigung von Doppelbestimmungen.

### **3.5.3. Reverse Transkription**

Die vorliegenden RNA-Sequenzen dienen als Grundlage für die Generierung komplementärer cDNA-Sequenzen, die letztendlich das Substrat für die PCR darstellen. Das Prinzip der „Reversen Transkription“ garantiert dabei eine regelhafte Syntheseleistung und ließ sich unter Zugabe eines RT-haltigen Master Mixes (Omniscript RT Kit (Reverse Transkriptase = RNA-abhängige DNA-Polymerase), RNasin, Primer Random) realisieren. Hierzu wurden die RNA-Isolate und Master Mix-Substanzen auf Eis aufgetaut (Omniscript RT und RNasin auf Kälteblock), gevortext und zentrifugiert. Unter Berücksichtigung der mRNA-

Konzentrationsbestimmungen konnten die angestrebten Volumina der Proben (2 µg der isolierten und quantifizierten mRNA) berechnet und in GeneAmps pipettiert werden. Um die Volumenäquivalenz der Proben zu erhalten, wurden diese durch Zugabe von DEPC-Wasser auf insgesamt 10 µl Volumen gebracht. Der anschließende Ansatz einer Master-Mix-Stocklösung richtete sich nach der Anzahl der Ansätze: 2 µl Buffer RT/Ansatz, 2 µl dNTP Mix/Ansatz, 2 µl DEPC-H<sub>2</sub>O/Ansatz, 2 µl Primer Random/Ansatz, 1 µl RNAsin (10U/µl) /Ansatz und 1 µl Omniscript RT (4U/µl)/Ansatz. Die RT-Produkte wurden nun mit äquivalenten Master Mix-Volumina versetzt (Gesamtvolumen: 20µl/Ansatz) und gevortext. Eine mehrphasige Inkubation im Anschluss ermöglichte die Reagibilität der Lösung. Durch Erwärmung auf 37°C für eine Stunde in einem Wasserbad, wird die Reverse Transkription von RNA in cDNA induziert und unterhalten. Die Terminierung der Reaktion garantiert eine anschließende Erhitzung der Ansätze in einem Metallblockthermostat für 5min bei 93°C, wodurch ein Aktivitätsverlust der Reversen Transkriptase provoziert wird. Abschließend erfolgte noch eine 5-minütige Inkubation auf Eis und eine Zentrifugation. Zur Lagerung wurde das somit erhaltene RT-Produkt bei -20°C eingefroren.

#### 3.5.4. PCR

Um die erwünschten Nukleinsäuresequenzen selektiv anzureichern, ist der Einsatz spezifischer sense- und antisense-Oligonukleotidprimer erforderlich, welche komplementär zum 3'- bzw. 5'-Ende des zu polymerisierenden DNA-Einzelstrangs sind. Wir verwendeten Primer folgender Sequenzen zur Amplifizierung eines 399bp großen LOX cDNA-Fragments: sense- Primer: 5'-TTACCCAGCCGACCAAGATA-3' und anti-sense-Primer: 5'-CTGAGGCATACGCATGATGT-3'. Als Standard wurde Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) ebenfalls amplifiziert. Der Einsatz dieser Primer induziert die Ausbildung eines kurzen doppelsträngigen Bereichs, sowohl am N-, als auch am C-terminalen cDNA-Strangende, wodurch ein Angriffspunkt für die thermostabile DNA-Polymerase geschaffen wird, die im weiteren Verlauf den Einzelstrang zum DNA-Doppelstrang polymerisiert. Es erfolgte der Ansatz einer Stocklösung von 5 µl 10×Reaktionspuffer S, 1 µl dNTPs, 1 µl Primer forward, 1 µl Primer reverse, 0,2 µl Taq-Polymerase und 39,8 µl DEPC-H<sub>2</sub>O pro Ansatz. Nach Durchmischung wurden je 48 µl dieser Lösung zu je 2 µl entsprechender cDNA pipettiert, die Suspension gevortext und anschließend zentrifugiert. Die so entstandenen Ansätze wurden programmierbaren Thermoblöcken zugeführt, die eine automatisierte Durchführung der PCR gewährleisten. Produktspezifisch erfolgen dabei mehrere Repetitionen dreiphasiger Zyklen aus Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing) und Kettenverlängerung (Elongation). Jeder unserer PCR-Zyklen bestand aus Denaturierung bei 94°C für 30s, Annealing



bei 53°C für 30s und Elongation bei 72°C für 60s. Insgesamt wurden für LOX 40 und für GAPDH 22 Zyklen durchgeführt. Danach wurden jeweils gleiche Mengen korrespondierender LOX- und GAPDH RT-PCR-Produkte (jeweils 20 µl Probe + 5 µl Ladepuffer) auf 1,2%iges Agarosegel geladen und im elektrischen Feld für 30 min bei 70 V aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgte schließlich durch optische densitometrische Auswertung der durch Ethidiumbromid angefärbten Banden.

### 3.5.5. Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine Amplifizierungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, aber zusätzlich die parallele Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Diese zusätzliche Option wird durch den Einsatz von fluoreszierenden Farbstoffen gewährleistet, die mit der DNA interkalieren. Fluoreszenzmessungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus („Real Time“) detektieren das Signal, dessen Intensität sich proportional zur Anzahl der PCR-Produkte verhält. Die Fluoreszenz wird während der PCR über eine Erregung von Fluorochromen in der PCR-Lösung mittels Laser induziert und durch eine Kamera in Echtzeit festgehalten. Wir nutzten als solches Fluorochrom den DNA-bindende Farbstoff SYBR Green I [106]. Als ungebundene Isoform in Lösung, fluoresziert er nur schwach in der Denaturierungsphase, wohingegen die Interaktion mit doppelsträngiger DNA während der Elongation eine signifikant verstärkte Fluoreszenz provoziert.

Die Korrelation zwischen der Steigerung der Fluoreszenzintensität in der PCR-Lösung und der parallelen Zunahme der Anzahl an PCR-Amplicons (Exponentialfunktion) erlaubt also eine zeitnahe Beurteilung und Analyse der PCR-Progression. Aus den so erhaltenen Daten wird für jede Probe ein Amplification-Plot (Fluoreszenzsignal vs. Zyklusnummer) erstellt und der  $C_T$ -Wert (fraktionelle Zyklusnummer, bei der das Fluoreszenzsignal eine definierte Schwelle überschreitet) ermittelt.

Sowohl RT-Konstrukte, als auch Zielgen-Primer (Rac1, CTGF und TGF- $\beta$ 1), Referenzgen-Primer (GAPDH bei der Maus, 18S beim Menschen) und RNA-Standards wurden auf Eis aufgetaut und die jeweiligen PCR-Verdünnungen in MicroAmp-96-Well-Reaktionsplatten hergestellt. Pro Bedingung wurden 12,5µl Puffer (SYBR Green), je 1µl (5µM) der Primer, sowie 1µl des RT-Produktes (cDNA), 0,5µl des Referenzfarbstoffes (Rox) und 7µl Wasser eingesetzt. Die PCR-Ansätze wurden abgedeckt, zentrifugiert und schließlich dem Taq-Man-System von Applied Biosystems zugeführt.

Die Bestimmung der quantitativen Genexpression erfolgte nach der komparativen  $C_T$ -Methode durch Berechnung der relativen Effizienz von Zielgen- und Referenzgen-Amplifikation. Es

wurden die mRNA-Expressionen der jeweiligen Faktoren (TGF- $\beta$ 1, CTGF und Rac1) auf die Expression des Housekeeping Gens GAPDH bzw. 18S bezogen.

### **3.6. Immunhistochemische Färbungen**

#### **3.6.1. Bestimmung des Kollagen-Gesamtgehalts**

Zur Quantifizierung des Total-Kollagengehalts pro mg Protein, wurden aus entsprechenden, in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten, Proben (humane linksatriale Appendices, sowie RacET-Herzen) Schnitte von 15 $\mu$ m hergestellt und mit 0,1% Sirius Red F3BA angefärbt. Dieser Farbstoff gilt als spezifischer Indikator für Kollagen-Komponenten. Nicht-Kollagen-Komponenten konnten dagegen durch Fast Green FCF dargestellt werden. Die anschließende gleichzeitige Eluierung beider Farbstoffe mit NaOH/Methanol und Detektion der Absorptionen bei 540 und 605nm ermöglichte die Bestimmung der Kollagen-Menge. So konnte der Grad an interstitieller Fibrosierung in den Geweben quantifiziert werden.

#### **3.6.2. Bestimmung des Gehalts an Kollagen-Crosslinks**

Die Bestimmung des Gehalts an Kollagen-Crosslinks erfolgte durch Differenzierung in unlösliches (=cross-linked) und lösliches (nicht-cross-linked) Kollagen mittels kolorimetrischer Detektion. Hierzu wurden, neben den bereits eingefärbten Schnitten zur Ermittlung des Gesamt-Kollagens, Gewebeproben der entsprechenden linksatrialen Appendices bzw. RacET-Herzen herangezogen. Es erfolgte eine nächtliche Inkubation dieser Proben mit 0,1mg/ml Pepsin in 0,5mol/L Essigsäure. Diese Behandlung führte zu einer Freisetzung des löslichen myokardialen Kollagens, welches anschließend mit Hilfe eines Sircol Kollagen Assay Kits (Tebu-Bio, USA), in Bezug auf lösliches Typ I Kollagen als Standard, quantifiziert werden konnte. Der Gehalt an unlöslichem Kollagen konnte nun, durch Subtraktion der Menge an löslichem Kollagen von der Menge des bestimmten Total-Kollagens, berechnet werden. Des Weiteren ergibt sich der Grad des Kollagen-Crosslinkings aus dem Verhältnis zwischen unlöslichem und löslichem Kollagen.

### 3.7. Immunfluoreszenzanalysen

Paraffinschnitte aus linksatrialem humanem Gewebe dienten als Substrat für indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen. Hierzu wurden die Schnitte mit monoklonalen Antikörpern gegen  $\alpha$ -sarkomerisches Aktin zur Anfärbung von Kardiomyozyten, gegen LOX und gegen Vimentin zur optischen Darstellung von Fibroblasten inkubiert. Als Sekundärantikörper fungierte FITC- oder TRITC-konjugiertes anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG oder anti-mouse IgM. Alleinige Inkubation separater Schnitte mit den jeweiligen Sekundärantikörpern lieferte Negativkontrollen um unspezifische Bindungen herauszumitteln. Zellkerne wurden mittels DAPI im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

Der isolierte linksatriale Appendix wurde hierzu zunächst postoperativ für eine Nacht bewässert. Zur Anfertigung der Paraffinschnitte erfolgte im Anschluss eine Entwässerung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol, sowie die Einlegung in Paraffin. Schließlich wurden mittels Mikrotom 5  $\mu$ m dünne Päraratschnitte auf einen Objektträger aufgetragen und die Adhäsion bei 60 °C gefestigt.

#### 3.7.1. LOX-Immunfluoreszenzfärbung

Die Gewebeschnitte wurden zunächst in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und in destilliertem Wasser sowie in PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie für 1 min in 0,001%igem Triton belassen, worauf eine erneute Waschung mit PBS-Puffer folgte. Nach 30-minütiger Blockung in 0,5% BSA (20 min Raumtemperatur, 10 min im Wasserbad bei 37°C), erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen LOX in einer Konzentration von 1:100 in der Blocking-Lösung über Nacht bei 4 °C. Am folgenden Tag wurden die Schnitte für zwei Stunden in einer Feuchten Kammer im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend ungebundene Antikörperfragmente mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen. Danach folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper TRITC-anti-rabbit-IgG im Verhältnis 1:30 für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad. Ungebundene Antikörperfragmente wurden mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen und die Paraffinschnitte entweder gegen Vimentin oder gegen  $\alpha$ -sarcomeric Aktin weiter gefärbt.

### **3.7.2. Vimentin-Immunfluoreszenzfärbung**

Nach Abschluss der LOX-Färbung, wurden die Paraffinschnitte einer weiteren Primärantikörperinkubation unterzogen. Im Verhältnis 1:30 erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C mit Vimentin, gelöst in PBS-Tween-Puffer. Zur Bindungsintensivierung wurden die Schnitte am folgenden Tag zunächst für zwei Stunden in einer Feuchten Kammer im Wasserbad bei 37°C belassen. Die anschließend noch ungebundenen Antikörperfragmente wurden mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen, bevor der Sekundärantikörper Anti-Mouse FITC IgG in PBS-Tween-Puffer (1:30) appliziert wurde. Die folgende erneute Inkubation beschränkte sich auf eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad. Nachdem ungebundene Sekundärantikörperfragmente mit PBS-Tween-Puffer abgewaschen worden waren, wurden die Schnitte mit Dapi und Mounting Medium eingedeckt.

### **3.7.3. $\alpha$ -sarkomerisches Aktin-Immunfluoreszenzfärbung**

Neben Vimentin diente auch  $\alpha$ -sarkomerisches Aktin zur Gegenfärbung der LOX-Paraffinschnitte. Hierzu wurden diese, nach Waschung in SSC-Puffer, zunächst in SSC-Puffer + 4 % BSA für 10 Minuten bei 37 °C im Wasserbad geblockt, um freie Bindungsstellen zu besetzen. Diese Blocklösung diente im Anschluss gleichzeitig der Herstellung der Primärantikörperverdünnung ( $\alpha$ -sarkomerisches Aktin) im Verhältnis 1:30. Der Inkubation über Nacht bei 4 °C folgte am nächsten Tag zunächst wieder eine zweistündige Wärmeapplikation in der Feuchten Kammer im Wasserbad bei 37 °C. Anschließendes Abwaschen ungebundener Antikörperfragmente erfolgte mit SSC-Puffer. Im zweiten Schritt wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper Anti-Mouse IgM FITC im Verhältnis 1:50 in SSC-Puffer für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nachdem Waschung mit SSC-Puffer, konnten auch diese Schnitte mit Dapi und Mounting Medium eingedeckt werden und zu vergleichenden Analysen mit den weiteren Proben herangezogen werden.

### **3.7.4. Digitalisierung der immunfluoreszierenden Färbungen**

Die Färbungen wurden lichtmikroskopisch (NIKON Eclipse E600) mit einer Digitalkamera aufgenommen und mittels der Lucia G Software ausgewertet.

### 3.8. Statistische Auswertung

Die Intensitäten der Western Blot- und PCR- Banden wurden, anhand ihres spezifischen Musters, mittels Densitometrie quantitativ ausgewertet. Hierzu diente das Programm Labworks (Labworks 3.0 Software, UVP Inc., Upland/CA/USA). Die angegebenen Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Unpaired Student's t tests, Mann-Whitney Rank Sum Test und ANOVA, gefolgt von Newman-Keuls post-hoc Analysen wurden für einzelne bzw. mehrfache Vergleiche angewendet. Dazu wurde die Sigma Stat-Software, Version 2.0, verwendet. Statistische Signifikanz wurde für  $p < 0,05$  angenommen.

## 4. Ergebnisse

Die Komposition der extrazellulären Matrix beeinflusst die Persistenz von Vorhofflimmern [172]. Aus diesem Grund wurden bereits in Vorstudien Affymetrix-Analysen in humanen Vorhöfen durchgeführt, welche die Genexpressionsmuster hinsichtlich ihrer proliferativen Aktivität zwischen Patienten mit Vorhofflimmern und Sinusrhythmus verglichen. Dies trug zu Identifizierung von Molekülen bei, die mit der Rhythmusgenerierung in atrialen Myokardzellen assoziiert sind und denen eine mögliche kausale Bedeutung in der Genese der strukturellen Aberrationen unter Vorhofflimmern zukommt. Mehr als 2fach erhöhte Transkriptionsraten konnten so für mehrere mit interstitiellem Remodeling einhergehende Gene, wie COL1A, COL1A2, COL3A1 und CTGF detektiert werden. Außerdem imponierte die Ähnlichkeit der Expressionsmuster für CTGF und LOX [2]. Diese Beobachtung initiierte unseren Verdacht auf einen möglichen Zusammenhang der beiden Moleküle mit Auswirkung auf die extrazelluläre atriale Substanz. Daher wurde die Bedeutung der Lysyl Oxidase für die molekularbiologische Pathogenese von Vorhofflimmern geprüft.

Für die Vernetzung der Kollagenfibrillen spielt aber zusätzlich ein weiteres Protein der extrazellulären Matrix eine entscheidende Rolle: Das Glykoprotein Fibronectin. Fogelgren B. et al. beschreiben eine Interaktion zwischen LOX und Fibronectin. Durch den Support der proteolytischen Spaltung des enzymatischen Propeptids, ist Fibronectin nämlich an der Aktivierung der Lysyl Oxidase beteiligt [43]. Diesen Überlegungen folgend untersuchten wir außerdem die Rolle von Fibronectin für die Remodelingprozesse unter Vorhofflimmern.

### 4.1. Erhöhter Kollagengehalt und gesteigertes Kollagen-Crosslinking im Vorhofmyokard von Patienten mit Vorhofflimmern

Um die makroskopischen interstitiellen Fibrosierungen und die damit verbundene Dilatation der Vorhöfe auf molekularer Ebene nachzuvollziehen, wurden Proteinexpressionsanalysen humaner linksatrialer Appendices auf deren Gehalt an Kollagen und Kollagen-Crosslinks untersucht [4;86]. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt. Es zeigte sich ein erhöhter Total-Kollagengehalt bei Patienten mit Vorhofflimmern ( $n=5$  pro Gruppe,  $65\pm7$  vs.  $37\pm5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein,  $p<0,05$ ) im Vergleich zu solchen, die sich im Sinusrhythmus befanden. Die erhöhte Expression war auf eine Steigerung des Gehalts an unlöslichem Kollagen zurückzuführen ( $62\pm6$

vs.  $32 \pm 5 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein,  $p < 0,05$ ), wohingegen der Gehalt an löslichem Kollagen nahezu konstant blieb. Das Verhältnis zwischen unlöslichem und löslichem Kollagen beschreibt den Grad des Crosslinkings. Aus obigen Daten ergibt sich somit ein erhöhter Gehalt an Kollagen-Crosslinks bei Patienten mit Vorhofflimmern ( $21 \pm 4$  vs.  $8 \pm 2$ ,  $p < 0,05$ ).

Einen möglichen Zusammenhang zwischen dem erhöhten Kollagengehalt bei Patienten mit Vorhofflimmern und dem bereits in früheren Versuchsreihen eruierten Signaltransduktionsweg könnte das Enzym LOX darstellen. Das oben beschriebene Screening mittels Affymetrix-Analyse aus ca. 25000 Genen ergab eine mehr als 2fach erhöhte Transkription des LOX-Gens in Proben von Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zu solchen ohne Rhythmusstörung ( $p < 0,01$ ). Da LOX, als Enzym, welches das Fibrillencrosslinking von Kollagen-I und -III katalysiert, die extrazellulären Matrixstrukturen nachhaltig beeinflusst, würde eine Involvierung in die entsprechende Signalkette die profibrotischen Umbauvorgänge in der Pathogenese des Vorhofflimmerns erklären (Abbildung 2). Die erwähnte Ähnlichkeit der Genexpressionsmuster von LOX und CTGF im pathologischen Vorhofmyokard lässt zusätzlich potenzielle Rückschlüsse auf einen direkten Regulationsmechanismus der beiden Moleküle zu.

## **4.2. Erhöhte LOX-Expression im Vorhofmyokard von Patienten mit Vorhofflimmern**

Um die Daten aus der Affymetrix-Analyse zu bestätigen, untersuchten wir zunächst die Expression der Lysyl Oxidase auf mRNA-Ebene mittels PCR. Diese zeigte eine mehr als 2fache Steigerung des LOX-Gehalts im Herzohr von Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zum Sinusrhythmuspatienten ( $218 \pm 42\%$ ,  $p < 0,05$ ).

Auf Proteinebene ergaben Western Blot Analysen dieser Proben bei Vorhofflimmern ebenfalls eine signifikante Hochregulation von LOX um mehr als das Doppelte ( $250 \pm 13$ ,  $p < 0,05$ ).

Um die Resultate zusätzlich durch eine dritte Methode zu unterstreichen, führten wir weiterhin indirekte Immunfluoreszenz-Analysen durch. Der Vergleich aus erkranktem und gesundem Gewebe demonstrierte in der Übersichtsaufnahme (10fache Vergrößerung) eine deutliche Vervielfältigung der LOX-Expression in den Proben, die den Herzohren von Patienten mit Vorhofflimmern entstammten, verglichen mit solchen von Patienten im Sinusrhythmus.

Diese Analysen zeigen also eine Änderung der Expression der kardialen Lysyl Oxidase. Sowohl Transkription (Affymetrix-Assay und RT-PCR), als auch Translation und anschließende

Modifizierung (Western Blot und Immunfluoreszenz-Analyse) korrelieren positiv mit dem Auftreten von Vorhofflimmern.

Zur weiteren Charakterisierung von LOX und seiner Funktion für kardiales Remodeling, galt es zunächst nun das Enzym im atrialen Zellverband zu lokalisieren und anschließend potenzielle Regulationsmechanismen zu erörtern.

### **4.3. LOX-Expression in kardialen Fibroblasten**

Das bisherige Untersuchungsmaterial umfasste stichprobenartig entnommene Lysate aus menschlichem Vorhofgewebe und beinhaltete somit sämtliche im linken Herzohr vorkommende Zelllinien. Die Lokalisationsdiagnostik der Lysyl Oxidase machte dagegen das gezielte Anfärben ausgewählter Zelltypen mittels Immunfluoreszenz erforderlich.

Entsprechend Abbildung 7, wurden zwei unterschiedliche Reihen erstellt, nachdem die Lysyl Oxidase im Zellverband sichtbar gemacht wurde: Zur Darstellung von Zellen myokardialen Ursprungs wurden Paraffin-Schnitte aus pathologischem und gesundem Vorhofmyokard mit monoklonalen Antikörpern gegen  $\alpha$ -sarkomerisches Aktin inkubiert. Die zweite Versuchsreihe konzentrierte sich auf das Anfärben der interstitiellen Fibroblasten mittels anti-Vimentin in entsprechenden Vorhofmyokardproben der Patienten mit und ohne Vorhofflimmern. Die 100fach vergrößerte Vergleichsaufnahme beider Reihen zeigte eine intrafibroblastäre interkardiomyozytäre Lokalisation des LOX-Proteins in humanem linksatrialen Gewebe.

Resultierend aus diesem Ergebnis, führten wir die weiteren Beobachtungen und Charakterisierungen zur Einordnung der Lysyl Oxidase auf molekularer Ebene mittels eines Zellkulturmodells aus neonatalen kardialen Rattenfibroblasten durch.

### **4.4. Rac1-abhängige Regulation der LOX-Proteinexpression durch AngII**

Einen ersten Zusammenhang zwischen dem aktivierten LOX-Protein und der bereits bestehenden Theorie zum Ablauf der Signalübertragung lieferten die Western Blot-Analysen zur Proteinexpression unter dem Einfluss einer AngII-Behandlung.



Hierzu wurden kardiale neonatale Rattenfibroblasten über 3 Std mit 1 $\mu$ M AngII inkubiert, um anschließend etwaige Differenzen in der Proteinexpression auszumachen. Abbildung 8 zeigt die deutlich erhöhten LOX-Expressionsmuster unter der AngII-Behandlung ( $214 \pm 16\%$ ).

Der Regulationsmechanismus der LOX-Expression durch Ang II ist möglicherweise auf zwei potenzielle Signalübertragungswege zurückführbar, die womöglich in mehr oder weniger enger Korrelation miteinander stehen. Zum einen durch Stimulation von TGF- $\beta$ , dessen Vermögen die LOX-Expression zu regulieren, nachgewiesen ist [66]. Zum anderen über Produktion von ROS durch die Rac1-GTPase, die wiederum die CTGF-Konzentration steigert [2]. Beide Wege haben wir identifiziert und entsprechende Beeinflussungsmöglichkeiten untersucht.

Da AngII als Regulator von Rac1 bekannt ist und in der Transduktionskette diesem vorangeschaltet ist, sollten nachfolgende Untersuchungen des Weiteren feststellen, ob auch die Rac1-GTPase an der Beeinflussung von LOX und somit an dem vermehrten Kollagengehalt durch Überexpression des Enzyms beteiligt ist. Um den Einfluss der Rac1-GTPase auf die Expression des Enzyms zu überprüfen, nutzen wir den Rac1-small-molecule-inhibitor NSC23766, der die Rac-spezifischen Guanin-Nukleotid-Exchange-Factors (GEFs) TrioN und Tiam1 hemmt, ohne dabei Einfluss auf die Aktivität von Cdc42 und RhoA zu nehmen.

Die Western Blot-Analysen zeigten, dass auch die Rac1-GTPase den LOX-Gehalt in kardialen Fibroblasten modulierte. Der Einsatz von NSC über 21 Stunden mit einer Konzentration von 100nM bewirkte eine signifikante Herabregulierung der LOX-Expression ( $84 \pm 16\%$ ,  $p < 0,05$ ) und auch die nachfolgende Behandlung mit AngII hatte, unter Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor, keinen Effekt.

Diese Daten veranschaulichen, dass die AngII induzierte Steigerung des LOX-Gehalts über die Zwischenschaltung der Rac1-GTPase läuft, und dass bereits hier ein Regulationsmechanismus existiert, um die Expression des für vermehrte Fibrosierung verantwortlichen Enzyms LOX zu beeinflussen.

#### **4.5. Regulation der LOX-Proteinexpression durch CTGF**

Da vorherige Untersuchungen bereits eine Interaktion zwischen der Rac1-GTPase und CTGF vermuteten, galt es nun zu eruieren, ob auch CTGF in der Lage ist LOX zu regulieren (Abbildung 9A) [2].

Um CTGF als wahrscheinlichen Mediator der LOX-Expression zu bestätigen, nutzten wir den gleichen Versuchsaufbau wie zuvor. Kardiale Fibroblasten aus Ratten wurden mit rekombinantem CTGF (1ng/ml) für eine Stunde behandelt, geerntet und mittels Western Blot auf die Proteinexpression von LOX untersucht. Eine signifikante Erhöhung der Enzymmenge

konnte unter den Behandlungsbedingungen beobachtet werden. Die Verdopplung des LOX-Gehalts ( $218 \pm 34\%$ ,  $p < 0,05$ ) lässt einen direkten Zusammenhang zwischen dem Botenstoff CTGF und dem profibrotisch wirksamen Enzym vermuten.

Um die in Vorstudien beschriebene Position von CTGF upstream der NADPH-Oxidase in der Signaltransduktion zu bestätigen, wurde unter oben beschriebenem Versuchsaufbau außerdem der Effekt auf die Rac 1-GTPase getestet. Hier blieb die Behandlung mit rekombinantem CTGF ohne Auswirkung auf die Enzymaktivität, was die ursprünglichen Ergebnisse bestätigt (Abbildung 9B).

#### **4.6. CTGF-Abhängigkeit des AngII-Signals auf die LOX-Proteinexpression**

Aufgrund der vermuteten Beeinflussung von LOX durch CTGF unter der Regulation durch die Rac 1-GTPase, wurden neonatale kardiale Fibroblasten mit small interfering RNA (siRNA) für CTGF transfiziert. Dies bewirkt eine Inhibition der Proteinsynthese von CTGF und stellt somit eine Interruption in der Signalübertragung dar. Eine Inkubation mit AngII dürfte also nicht den oben beschriebenen Effekt auf die LOX-Expression haben, sobald der Signalüberträger CTGF ausgeschaltet ist. Der Effekt der Rac 1-Aktivierung durch AngII bestünde allerdings weiterhin (Abbildung 10).

Die Western Blot-Analysen konnten diese Theorie signifikant bestätigen und zeigen, dass CTGF Rac1-abhängig als Mediator von LOX fungiert und mit dem Enzym in der Signaltransduktionsabfolge upstream verschaltet ist. Der CTGF-Knockdown verhindert das Fortlaufen der Signalübertragung von der AngII-Stimulation über die Aktivierung der Rac 1-GTPase und der anschließenden Expressionssteigerung von CTGF bis hin zur Erhöhung des Lysyl Oxidase-Gehalts an der Stelle, an der vermehrt connective tissue growth factor synthetisiert werden soll. Dies bedeutet ein Sistieren der Signalübertragung. Deswegen wird der Effekt, den eine AngII-Behandlung auf die LOX-Expression ausübt, in den transfizierten Zellen vollständig unterbunden.

So konnte die Regulierung des Expressionsgehalt der Lysyl Oxidase molekularbiologisch nachvollzogen werden und ein vorläufiges Schema erstellt werden, welches die LOX-Expressionssteigerung, über eine AngII-Stimulation mit nachfolgender Rac1- und CTGF-Aktivierung, erklärt.

#### 4.7. Reduktion der LOX-Proteinexpression durch Statine

Um unsere bisherigen Ergebnisse aus den Zellkulturreihen *in vivo* zu bestätigen, nutzten wir ein Modell transgener Mäuse. Das Untersuchungsmaterial stammte aus Tieren, welche eine herzspezifische Überexpression der konstitutiv aktiven Rac1-GTPase, unter der Kontrolle des alphaMHC-Promotors (RacET), um das etwa 30fache aufwiesen und deren Vorhöfe im Alter von 10 Monaten spontan zu flimmern anfangen [1].

Wie verschiedene Vorstudien zeigen, vermag die Gabe von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern den Verlauf von Vorhofflimmern zu modulieren [2;29;116;140]. Aufgrund dieser Ergebnisse galt es zu überprüfen, inwieweit diese Therapieoption auch Auswirkungen auf die pathophysiologischen Vorgänge auf molekularer Ebene hat. In den Vorstudien erreichte eine Behandlung mittels Rosuvastatin eine Herabregulierung der Rac1-Expression auf  $77 \pm 3,3\%$  ( $p < 0,05$ ). Die Applikation erfolgte oral mit 0,4 mg pro kg Körpergewicht und Tag über 10 Monate. Die Tiere wiesen eine verminderte Rate an Vorhofflimmern auf, im Vergleich zu ihren Artgenossen, welche kein Statin erhalten hatten. Die Steigerung der Rac1-Expression führte zu einer deutlichen Zunahme des CTGF-Gehalts in den Zellen ( $369 \pm 28\%$ ,  $p < 0,001$ ), welcher, ebenso wie die Rac1-GTPase-Aktivität, der Regulierung durch eine Rosuvastatinbehandlung unterlag [1;2]. Zu klären galt nun, inwiefern auch die Expressionen von LOX, Kollagen und Kollagen-Crosslinking von einer Statinbehandlung beeinflusst werden.

Die Heraufregulierung der Rac1-Aktivität in RacET-Mäusen und die Vermehrung des CTGF-Gehalts ließen die Vermutung naheliegen, dass auch die Expression von LOX in diesen Tieren verändert sei. Wir konnten diese Annahme durch Western Blot-Analysen aus den entsprechenden Proben bestätigen, wie Abbildung 11 zeigt. Der Anstieg des LOX-Gehalts ( $187 \pm 7\%$  vs. Wildtyp,  $p < 0,001$ ) konnte durch die Statinbehandlung vermieden werden und somit ein therapeutischer Angriffspunkt ermittelt werden. Interessanterweise konnte die Expressionssteigerung detektiert werden bevor die Tiere zu flimmern begannen. Als ätiologischer Hinweis zur Genese von Vorhofflimmern und effektive Inhibierung mittels Statinverabreichung, offenbart der Eingriff in den LOX-Metabolismus eine potenzielle Therapieoption zur Prävention der Rhythmustörung.

## 4.8. Reduktion des Kollagengehalts und des Kollagen-Crosslinkings durch Statine

Ob die Veränderungen der Proteinexpressionen der vorangeschalteten Enzyme und Botenstoffe auch tatsächlich ein Korrelat im Fibrosierungsgehalt des Gewebes finden, untersuchten wir mit einer weiteren Western Blot-Analyse. Der Totalkollagengehalt wurde, ebenso wie der von löslichem und unlöslichem Kollagen, quantifiziert und ergab, entsprechend Abbildung 12, eine signifikante Steigerung in den RacET Mäusen gegenüber dem Wildtyp. Auch hier konnte der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer den Effekt nahezu aufheben (RacET  $28 \pm 2$  vs. RacET + Statin  $22 \pm 0.8$  yg/mg Protein,  $p < 0,05$ ).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch beim Kollagen-Crosslinking. Die Überexpression der Rac1-GTPase beeinflusste signifikant die Menge an Crosslinks. Es zeigte sich eine Vermehrung der Fibrillenverknüpfung in den RacET-Mäusen, die durch Fütterung von Rosuvastatin-haltigem Futter gehemmt werden konnte (RacET  $10 \pm 0,7$  vs. RacET + Statin  $6 \pm 0,3$ ,  $p < 0,05$ ).

Damit vermuten wir, dass ein Eingriff in die Signaltransduktion, von der AngII-induzierten Rac1-Antwort ausgehend bis hin zur CTGF-getriggerten LOX-Aktivierung, direkten Einfluss auf den Fibrosierungsgehalt der Herzmuskulatur nimmt und dass eine Statin-Behandlung eine effektive Therapiemöglichkeit ist diesen Prozess des Remodelings zu bremsen.

Wie bereits weiter oben erwähnt, wird in der Literatur außerdem ein zweiter Regulationsmechanismus der Lysyl Oxidase beschrieben, der durch einen AngII-Reiz vermittelt wird [93]. Neben der Überproduktion von Superoxiden, induziert AngII auch die Synthesesteigerung von TGF- $\beta$ , das in Lungenfibroblasten als Stimulator von LOX und zusätzlich als positiver Reiz für die Kollagenproduktion des Gewebes gilt [11;66;152]. Diesen Überlegungen folgend, interessierte uns inwieweit diese Abfolge (AngII  $\Rightarrow$  TGF- $\beta$ 1  $\Rightarrow$  LOX) auch auf das Vorhofmyokard übertragbar ist und den Signalweg aus unseren bisherigen Erkenntnissen (AngII  $\Rightarrow$  Rac1  $\Rightarrow$  NADPH-Oxidase  $\Rightarrow$  ROS  $\Rightarrow$  CTGF  $\Rightarrow$  LOX  $\Rightarrow$  Kollagen) zu vervollständigen vermag. Wir erstellten hierzu Versuchsreihen in menschlichem Vorhofgewebe, sowie in transgenen Mäusen, die eine Überproduktion von TGF- $\beta$ 1 charakterisieren.

#### **4.9. Erhöhte TGF- $\beta$ 1-Expression im Vorhofmyokard von Patienten mit Vorhofflimmern**

Zunächst interessierte uns, ob eine Assoziation von TGF- $\beta$  und Vorhofflimmern existiert. Wir beschränkten uns in den Untersuchungen auf den Nachweis von TGF- $\beta$ 1, da diese Isoform überwiegend im Bindegewebe lokalisiert ist und unsere Versuchsreihen und Hypothesen in kardialen Fibroblasten erstellt wurden. Die humanen linksatrialen Herzohrproben dienten auch hier der ersten Einordnung und Richtungsweisung. Wir zogen diese Proben also zu Real-Time-PCR- und Western-Blot-Analysen heran und detektierten jeweils den TGF- $\beta$ 1-Gehalt im Gewebe. Die Quantifizierung ergab letztendlich eine signifikant gesteigerte Expression des Zytokins, sowohl auf mRNA-, als auch auf Protein-Ebene. Die Darstellung dieser Zusammenhänge erfolgt in Abbildung 13.

#### **4.10. Regulation der CTGF-mRNA-Expression durch TGF- $\beta$ 1**

Zur Charakterisierung des potenziellen Einflusses eines TGF- $\beta$ 1-Reizes auf die kardiale LOX- und CTGF-Expression, fand ein weiteres Modell transgener Mäuse Einzug in unsere Untersuchungen. Wir verwendeten Myokardproben von TGF- $\beta$ 1-überexprimierenden Mäusen, deren kardiale TGF- $\beta$ 1-Expression um das 7-fache über der von vergleichbaren Kontrolltieren lag. So konnten Zellstimulationen mit dem Zytokin *in vivo* imitiert werden und deren Effekte durch molekularbiologische Analysen nachgewiesen werden. Nach Entnahme separierten wir das Gewebe zum einen für Nukleinsäure- (CTGF und Rac1), zum anderen für Western Blot-Quantifizierungen (Rac1 und LOX).

Als erstes Downstream-Substrat des TGF- $\beta$ 1-Signals quantifizierten wir den connective tissue growth factor im Herzgewebe der beschriebenen genetisch modifizierten Tiere mittels Real-Time-PCR (Abbildung 14). Beobachten konnten wir eine mehr als 3-fach erhöhte Expression des Mediators in den TGF- $\beta$ 1-Mäusen, im Vergleich zu den Wildtypen.

#### **4.11. Regulation der LOX-Proteinexpression durch TGF- $\beta$ 1**

Zweiter Kandidat der Untersuchungsreihe im Myokard der gentechnisch veränderten Mäuse war die Lysyl Oxidase, deren fibroproliferative Effekte bereits dargelegt und deren Regulation durch

CTGF im kardialen Zellverband belegt wurde. Die Quantitätsmessungen der Enzymexpression in den transgenen Mäusen erfolgten mittels Western Blot-Analyse und bestätigten die vermutete Assoziation mit TGF- $\beta$ 1. Es konnte ein gesteigerter Gehalt von LOX in den modifizierten Tieren, verglichen mit den Kontrollmäusen, beobachtet werden. Allerdings liegt das Ausmaß der Expressionszunahme unterhalb der Signifikanzgrenze. Graphische Darstellung erfahren diese Ergebnisse in Abbildung 15.

Um nicht fälschlicherweise die Alternativhypothese zu verwerfen, eruierten wir dieser entsprechend („Es existiert eine Involvement von TGF- $\beta$ 1 in die myokardiale arrhythmogene Signaltransduktion“), den Effekt des Zytokins auf die Rac1-GTPase.

#### 4.12. Regulation der Rac1-Expression durch TGF- $\beta$ 1

Aufgrund der Signifikanzverfehlung der TGF- $\beta$ 1-abhängigen LOX-Proteinexpressionssteigerung, untersuchten wir den Effekt, den die kardiale Überexpression des Zytokins in den modifizierten Mäusen womöglich auch auf die Expression der Rac1-GTPase ausübt, auf zwei Ebenen. Zunächst quantifizierten wir mittels Real-Time-PCR den mRNA-Gehalt des Gewebes aus den TGF- $\beta$ 1-Tieren im Vergleich zu dem der Kontrollgruppe. Die Verdopplung der Transkriptionsrate erlaubte erste Rückschlüsse auf eine Interaktion von TGF- $\beta$ 1 mit Rac1 und eventueller nachfolgender Anregung der Superoxidproduktion. Gleichzeitig ließen Western Blot-Analysen eine Übertragung der Gewebeantwort auf Proteinebene zu. Hier bestätigt die signifikant erhöhte Proteinexpression in den veränderten Mäusen das Ergebnis der PCR (Abbildung 16).

Die Resultate der CTGF-, LOX- und Rac1-Quantitätsmessungen in den TGF- $\beta$ 1-Mäusen erlauben bereits vorsichtige Spekulationen über die Teilhabe von TGF- $\beta$ 1 an den Signalwegen im Myokard. Die bisherigen Assoziationen bedürfen allerdings noch einer weiteren Abklärung mittels eines dynamischen Modells, das, durch Stimulation und/oder Inhibierung der einzelnen Reizkonduktoren, eine detailliertere Charakterisierung der molekularen Vorgänge gewährleistet.

Nicht allein die Lysyl Oxidase ist für die Vernetzung der Kollagenfibrillen verantwortlich. Vielmehr haben eine Vielzahl von unterschiedlichsten Molekülen an der Generierung der Crosslinks zwischen den einzelnen Kollagenfibrillen teil. So auch das Glykoprotein Fibronectin. Wegen seiner Fähigkeit die Komposition der extrazellulären Matrixstrukturen zu beeinflussen und der gleichzeitigen Beteiligung an der Aktivierung von LOX durch Förderung der posttranslationalen proteolytischen Spaltung, untersuchten wir des Weiteren, ob unter Vorhofflimmern auch der Gehalt an Fibronectin Veränderungen unterliegt.

#### **4.13. Erhöhte Fibronectin-Proteinexpression im Vorhofmyokard von Patienten mit Vorhofflimmern**

Wir untersuchten die Fibronectin-Proteinexpression in den gleichen linksatrialen menschlichen Appendices, in denen auch schon der vermehrte Gehalt an Kollagen-Crosslinks, sowie eine Steigerung des LOX- und des TGF- $\beta$ 1-Gehalts detektiert wurden. Das Vorhofmyokard bei Patienten, die unter Vorhofflimmern litten, zeigte tatsächlich eine Verdopplung der Fibronectin-Expression ( $236 \pm 38$  % vs. SR,  $p < 0,05$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 graphisch dargestellt.

#### **4.14. LOX-abhängige Regulation der Fibronectin-Proteinexpression durch AngII und CTGF**

Da die Rolle und Position von LOX in dem Signaltransduktionsweg, welcher zur Generierung von Vorhofflimmern führen vermag, näher charakterisiert wurde und Fogelgren et al. bereits 2005 eine Interaktion zwischen LOX und Fibronectin bereits beschrieben, galt es nun die Abhängigkeit der beiden Moleküle voneinander zu bestimmen.

Den vermuteten Einfluss von LOX auf den Fibronectin-Gehalt untersuchten wir in einem weiteren Zellkulturmodell. Da bisherige Analysen eine Synthese und anschließende Sezernierung von Fibronectin durch Fibroblasten beschrieben, isolierten wir diese aus den gleichen Tieren, an denen wir auch schon die Charakterisierung von LOX durchführten [114]. Eine Inhibierung der LOX-Expression wird nach derzeitiger Studienlage physiologisch durch Prostaglandin E2 und Isoniazid erreicht [12;153]. Wir nutzten hierzu b-aminopropionitrile (BAPN), einen spezifischen synthetischen LOX-Hemmstoff.

Neonatale kardiale Rattenfibroblasten wurden sowohl mit AngII ( $3\mu\text{g/ml}$  für 3 Std.), als auch mit rekombinantem CTGF ( $1\text{ng/ml}$  für 1 Std.) inkubiert und anschließend der Effekt auf die Fibronectin-Expression in der densitometrischen Analyse quantifiziert. Beide Metaboliten vermochten den Gehalt an Fibronectin in der Zelle zu steigern. Wurden die Fibroblasten allerdings mit BAPN ( $100\text{nM}$ ) für 21 Stunden vorinkubiert und anschließend sowohl mit AngII, als auch mit CTGF behandelt, blieb die beobachtete Vermehrung des Glykoproteins aus. Der ohne LOX-Hemmung beschriebene Effekt der vermehrten Proteinexpression unter Inkubation mit beiden Botenstoffen, konnte unter Einfluss von BAPN nicht detektiert werden. Somit reduziert eine Inhibition von LOX gleichzeitig die Synthese von Fibronectin und beschreibt die Abhängigkeit des Glykoproteins von dem Enzym, wie Abbildung 18 zeigt.

#### 4.15. Reduktion der Fibronektin-Proteinexpression durch Statine

Schließlich wurden auch quantitative Messungen in Form von Western Blot-Analysen gemacht, um die Auswirkungen der Rac1-Überexpression in den beschriebenen transgenen Mäusen auf das Glykoprotein Fibronektin zu eruieren (Abbildung 19). Hier zeigte sich eine deutliche Heraufregulierung des Fibronektin-Gehalts in den RacET-Mäusen ( $627 \pm 146\%$  vs WT,  $p < 0,05$ ). Und auch in diesem Modell konnte die Statin-Behandlung die Expression von Fibronektin senken ( $206 \pm 54\%$  vs. WT,  $p < 0,05$ ) und zeigen, dass diese Therapieoption den pathologischen Strukturveränderungen auf molekularer Ebene entgegenwirkt.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich eine mögliche Signaltransduktionskette ableiten, welche die Pathogenese von Vorhofflimmern, in Bezug auf das profibrotische Remodeling, auf molekularer Ebene erklärt. So führt AngII über die Aktivierung des Zytokins TGF- $\beta$ 1 und der resultierenden Stimulation der Rac1-GTPase zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die wiederum die Expression von CTGF steigern. CTGF führt dann zur Erhöhung der Proteinsynthese von LOX, die zum einen vermehrte Kollagen-Crosslinks induziert und zum anderen den Fibronektin-Gehalt in der Fibroblasten-Zelle erhöht. Fibronektin selbst ist, neben der Förderung der Quervernetzung der Kollagenfibrillen, auch an der weiteren Aktivierung der Lysyl Oxidase beteiligt und steigert somit durch positiven Feedback den Effekt von LOX. Damit wären wir vom Mediator AngII im kardiovaskulären System zur Fibrosierung und zum strukturellen Umbau des Vorhofs gelangt. Einen schematischen Überblick über die gesamten molekularen Prozesse liefert Abbildung 20.



## 5. Diskussion

Die Persistenz von Vorhofflimmern korreliert positiv mit dem Ausmaß der atrialen Gewebefibrosierung und mündet in der Ausbildung eines Circulus vitiosus aus strukturellem Remodeling und flimmerndem Myokardgewebe [20;40;53;86;91;109]. „Atrial fibrillation begets atrial fibrillation“ – das 1995 durch Wijffels et al. charakterisierte Phänomen der atrialen Rhythmologie, welches das Vermögen des Vorhofgewebes eine einmal aufgetretene Flimmerbewegung aufrecht zu erhalten beschreibt, wird durch diesen Pathomechanismus untermauert [169]. Jedoch herrscht Unklarheit über das Ereignis, das die erstmalige Manifestation einer fibrillierenden Episode einleitet. Diese fehlende Substratidentifizierung führt im klinischen Alltag häufig zur Diagnose des idiopathischen Vorhofflimmerns und erschwert den Einzug präventiver Maßnahmen in die Behandlungsstrategien der Erkrankung.

Im Zentrum unserer gesamten Forschungsreihe steht daher die Absicht zur Konzipierung einer Theorie bezüglich der Pathogenese von Vorhofflimmern. Es konnte ein molekularer Mechanismus identifiziert werden, der die interstitiellen Fibrosierungen im Rahmen von myokardialem linksatrialem Remodeling zu induzieren vermag. Im Mittelpunkt dieses Signalwegs steht das Enzym Lysyl Oxidase, dessen arrhythmogenes Potenzial bislang ungeklärt ist. AngII steigert die Expression von LOX über eine Aktivierung der small G-protein Rac1-GTPase und den profibrotisch wirksamen connective tissue growth factor und induziert so Kollagen-Crosslinks und interstitielle Fibrose im linken Vorhofmyokard.

Gleichzeitig werden Implikationen für die klinische Bedeutsamkeit dieser Erkenntnisse in Form von Therapieansätzen präsentiert, deren künftige Wertigkeit, besonders unter Berücksichtigung demographischer Entwicklungstendenzen, zunehmenden Charakter besitzt. Denn nur wenn die ätiologischen Vorgänge verstanden sind, können die bisherigen Interventionen bezüglich ihres örtlichen und zeitlichen Angriffspunktes optimiert werden und die symptomatische in eine kausale Behandlungsform modifiziert werden.

### 5.1. Identifizierung von Molekülen, die unter Vorhofflimmern einer Expressionsänderung unterliegen

Die zunehmende Konkretisierung des linken Atriums als topografischer Ursprung von flimmernden Episoden [110], begründete die Auswahl des Untersuchungsgewebes für eine erste

richtungsweisende Orientierung. Wir wählten humane linksatriale Appendices, die sich lediglich in der Präsenz von Vorhofflimmern oder Sinusrhythmus unterschieden. Im Weiteren bewiesen Analysen dieses Material bereits in Vorstudien eine Steigerung der AngII-, Rac1- und CTGF-Proteinexpression in arrhythmischem Gewebe [1;2]. Durch verschiedene Quantitätsprüfungen konnten wir veränderte Expressionsprofile von Kollagen, Kollagencrosslinks, LOX, TGF- $\beta$ 1 und Fibronectin detektieren. Die Assoziation von flimmerndem Parenchym und einem erhöhten Gewebegehalt der jeweiligen Proteine, ließ Interaktionen und gegenseitige Regulationsmechanismen vermuten, wie sie zum Teil in anderen Gewebetypen bereits nachgewiesen sind. So organisiert die Aminoxydase LOX lösliche Kollagenfibrillen durch Crosslinking in einer unlöslichen fibrotischen Matrix. Die Anzahl dieser Fibrillen wird dabei durch CTGF reguliert [26;67;110;146]. Dieser Mediator vermag gleichzeitig die Synthese eines weiteren Proteins der extrazellulären Matrix zu stimulieren. So erfährt Fibronectin CTGF-abhängig eine Expressionssteigerung und ist seinerseits beteiligt an der Aktivierung von LOX und Kollagen [26;32]. TGF- $\beta$ 1 dagegen gilt als Stimulus für die LOX-, Kollagen- und CTGF-Expression, wobei die jeweiligen Stoffwechselwege als unabhängige Pfade beschrieben werden [66]. Auch die LOX-Aktivität unterliegt einer Modulation durch TGF- $\beta$ 1, genauso wie einer Beeinflussung durch reaktive Sauerstoffspezies [70]. Diese wiederum sind Produkte der NADPH-Oxidase, welche durch Translokation der Rac1-GTPase aktiviert wird [1;17;31;83;97;151]. Als Initiator dieser örtlichen Verlagerung gilt letztendlich extrazelluläres AngII [23;44]. Es gibt derzeit bereits Spekulationen über eine Beteiligung von oxidativem Stress an der interstitiellen Fibrosierungstendenz im flimmernden Vorhof, die durch Inhibierung der Superoxid-Freisetzung nachweislich reduziert werden kann [2;56;75;140;167]. ROS sind hier mit substantiellen oxidativen Veränderungen im myokardialen Zellstoffwechsel assoziiert, die sich in veränderten Gentranskriptionsraten, Aktivitätsänderungen von Enzymen und mitochondrialen DNA-Schäden widerspiegeln [78;79;92].

Der Bedeutung dieser Aberrationen für die Genese von Vorhofflimmern ist ungeklärt. Erstmals fanden Studien in Zellen myokardialer Herkunft statt, die die Diversität der molekularen Beziehungen in einem komplexen Signaltransduktionsweg systematisch strukturierten.

## 5.2. Lokalisation im myokardialen Zellverband

Das Myokard besteht lediglich zu 30% aus Myozyten. Die übrigen Zellen setzen sich aus kardialen Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen zusammen und ergeben

in ihrer Gesamtheit ein komplex organisiertes Netzwerk aus elektrischer, biomechanischer und chemischer Kommunikation [22;108;148]. Jegliche Aberration dieser Konnektivität vermag maladaptive Störungen des kardialen Metabolismus und der strukturellen Integrität in Form von Remodelingvorgängen zu provozieren. Im atrialen Zellverband sind es die Fibroblasten, welche die Strukturen der extrazellulären Matrix synthetisieren und deren Stoffwechsel regulieren. Insbesondere die Kollagen- und Fibronectin-Produktion unterliegt dem Einfluss dieser Zellen mesenchymalen Ursprungs [73]. Ein Ungleichgewicht von Synthese und Degradation extrazellulärer Matrixkomponenten bestimmt die Dimension kardialen Remodelings durch Steigerung der mechanischen Gewebestärke, Unterbindung der elektrophysiologischen Kommunikation und Einleitung einer insbesondere diastolischen Dysfunktion [148]. Im Rahmen des Fibrosierungsprozesses unter Vorhofflimmern erfahren Fibroblasten somit eine besondere Bedeutung und erscheinen als potenziell ausschlaggebend für strukturelles Remodeling im Atrium. Unsere Lokalisationsanalysen mittels Immunfluoreszenz in linksatrialen Appendices ergaben eine Identifikation von LOX überwiegend in diesem Zelltypus, weshalb die weiteren Studien an Zelllinien mit gleichen Eigenschaftenrealisiert wurden. Schließlich wurden neonatale kardiale Rattenfibroblasten zur eingehenderen Charakterisierung herangezogen. Zur Validierung dieser Entscheidung wurden außerdem anfängliche Daten mit solchen myozytärer Herkunft verglichen. Das Signal der Myozyten war um ein vielfaches schwächer als das der Fibroblasten. Bestätigung findet die Identifikation der fibroblastären Zelle als Produzent einer LOX-Überexpression auch in den Studien von Boak et al. und Majora et al. [12;99]. Des Weiteren ist bekannt, dass humane kardiale Fibroblasten membranständige AT1-Rezeptoren exprimieren, welche, durch Mediation eines extrazellulären AngII-Signals, Fibrose zu induzieren vermögen [74].

### 5.3. Charakterisierung der Interaktionen *in vitro*

Die Adaptation der Herzdynamik unter pathologischen Bedingungen wird zumindest anteilmäßig durch die Beschaffenheit der ECM diktiert, die sämtliche mechanische, elektrophysiologische und chemische Kommunikationspfade determiniert. Die molekularen Signalwege, welche die extrazellulären Matrixkomponenten modifizieren, sind dabei weitgehend unverstanden. Dabei ist gerade ein besseres Verständnis der dynamischen Interaktionen zwischen ECM und den produzierenden Fibroblasten, die durch biochemische Mediatoren garantiert werden, essentiell für gegenregulatorische Therapiekonzepte.

Bisherige Studien konnten bereits Moleküle identifizieren und quantifizieren, die das atriale Rhythmusgeschehen nachhaltig beeinflussen. Es existieren mehrere Aktivatoren kardialer Fibroblasten, die den Gehalt an extrazellulären Matrixstrukturen regulieren können. Neben mechanischer Dehnung, Hypoxie und elektrischen Potenzialen, vermögen auch diese chemischen Faktoren als entsprechende Reize zu fungieren. So induzieren unter anderem AngII, TGF- $\beta$  und Endothelin ihre proliferative Wirkung über fibroblastäre Stimulation. In Abhängigkeit dieses Stimulus erfolgt die metabolische Zellantwort des Fibroblasten in Form einer quantitativen und/oder qualitativen Modifikation der Produktion und Sekretion von Signalmolekülen [15;38;148;166]. Absicht unserer Forschungsreihe war die Identifizierung, Charakterisierung und Systematisierung dieser Transduktionskette.

Einige Analysen postulieren die Existenz eines herzspezifischen lokalen Renin-Angiotensin-Systems (RAS) mit entscheidendem Einfluss auf die kardiale Funktion. AngII, als Effektormolekül des RAS, vermag außerdem, über Vermittlung durch den AT1-Rezeptor, die Synthese und Sekretion von Kollagen in kardialen Fibroblasten zu induzieren [35;81;90]. Als intrazellulärer Mediator fungiert dabei in erster Linie die Rac1-GTPase, welche downstream, über eine Koordination der NADPH-Oxidase mit Regulierung der Superoxidproduktion, die Proteinexpression von CTGF kontrolliert [2]. Dieser Wachstumsfaktor vermag zumindest in humanen Gingvia-Fibroblasten den extrazellulären Kollagengehalt zu erhöhen und wird hier durch TGF- $\beta$  reguliert [66]. Veränderte Expressionen dieses Zytokins im Rahmen der Herzinsuffizienz verraten auch seine kardiale Bedeutung. Neben ihrer Funktion als primäre Produzenten von TGF- $\beta$ , tragen kardiale Fibroblasten auch die TGF- $\beta$ -spezifischen Oberflächenrezeptoren und fungieren somit gleichzeitig als Effektorzellen [25]. Die ausgelöste auto- bzw. parakrine Zellantwort beinhaltet die Synthesesteigerungen von fibrillären Kollagenen, Fibronectin, Proteoglykanen und kontraktilen Genen, sowie die Reifung des Fibroblasten zum Myofibroblasten [37;61;85;163]. Als aktive differenziertere Form der ehemals ruhenden Fibroblastenzelle, weisen Myofibroblasten zusätzliche Marker auf und spielen eine Schlüsselrolle für reparative Fibrose und Myokardinfarkt. Des Weiteren scheinen flimmernde Kardiomyozyten Substanzen zu sezernieren, welche die fibroblastäre Funktion, hinsichtlich einer Differenzierung zum Myofibroblasten mit gesteigerter ECM-Syntheseleistung, zu modifizieren vermögen [19]. In normalem kardialen Gewebe dagegen lassen sich in der Regel keine Myofibroblasten ausmachen [21;148;154]. Wir konnten signifikant erhöhte TGF- $\beta$ -Profile in Patienten mit Vorhofflimmern detektieren und Assoziationen mit der Rac1/NADPH-Oxidase-Signaltransduktion ausmachen. Das hierfür zugrunde liegende Modell transgener Mäuse, zeichnete sich durch eine Überexpression von TGF- $\beta$ 1 in den Tieren aus. Sowohl der Rac1-, als auch der CTGF-Gehalt, zeigte einen signifikanten Anstieg in den Herzen der manipulierten Mäuse im Vergleich zu den murinen Wildtypen. Dies geht mit Ergebnissen aktueller Studien einher, die Assoziationen von TGF- $\beta$ 1 sowohl upstream mit dem AngII-, als auch downstream

mit dem LOX- und CTGF-Metabolismus beschreiben. Vor allem der kardiovaskuläre Mediator AngiotensinII gilt als eindeutig nachweisliches Stimulans des Zytokins. Hong et al. postulieren eine gesteigerte LOX-Aktivität in humanen Gingviafibroblasten als Antwort auf den TGF- $\beta$ 1-Trigger [11;44;47;54;66;139;152]. In einigen Tieren unseres Mausmodells konnte ebenfalls eine eindeutige Zunahme der LOX-Expression ausgemacht werden, welche jedoch knapp das Signifikanzniveau verfehlte.

Die Potenz zur Determinierung und Variation extrazellulärer Matrixkomponenten, insbesondere Kollagen I und III, disponiert LOX dennoch zu einem essentiellen Substrat für sämtliche profibrotische Prozesse [67;100]. Bisherige Studien konnten die Aminoxydase allerdings lediglich im linksventrikulären Myokard, im Rahmen von Myokardfibrose und dilatativer Kardiomyopathie, ausmachen [100;144]. Atriale LOX-Expressionen sind dagegen bislang noch nicht quantifiziert worden. Da sowohl Affymetrix-, als auch RT-PCR- und Western Blot-Analysen eine linksatriale LOX-Gehaltssteigerung unter Vorhofflimmern detektierten, die mit einer Zunahme der Kollagenmenge und einem erhöhten Kollagen-Crosslinking einherging, erstellten wir im Folgenden ein kardial-fibroblastäres Zellkulturmodell zur weiteren Charakterisierung der pathophysiologischen Vorgänge. Hierzu nutzten wir neonatale kardiale Rattenfibroblasten. Dass AngII in diesen Zellen als upstream-Mediator von CTGF fungiert, wurde bereits beschrieben [2;129]. Die downstream-Involvierung von LOX in diesen Signalweg gestaltet sich dagegen als völlig neuartiges Phänomen in der molekularbiologischen Forschung bezüglich Vorhofflimmerns. Sowohl AngII-, als auch CTGF-Behandlungsreihen, ergaben signifikante Anstiege der LOX-Proteinexpression, die, durch Transfektion mit small interfering RNA für CTGF oder durch Präinkubation mit einem Rac1-spezifischen small molecule inhibitor, nahezu vollständig unterdrückt werden konnten. Somit konnten CTGF und Rac1 als downstream-Mediatoren des extrazellulären AngII-Signals identifiziert werden, welche in der Folge die Steigerung der LOX-Expression in kardialen Fibroblasten induzieren.

Bisherige Forschungsarbeiten suggerieren im Weiteren eine Interaktion von LOX und Fibronectin, welches, als Glykoprotein der extrazellulären Matrix, diese zu regulieren vermag. In embryonalen Mäusefibroblasten beeinflusst Fibronectin beispielsweise die Aktivität von LOX [43;98;114;147;162]. Die Formation der Fibronectin-Matrix gilt dabei als entscheidendes Kriterium für die nachfolgende Anordnung der Kollagenfibrillen Typ I und III [147;162]. Diesbezügliche Daten in Vorhofgewebe existieren bislang nicht. In den *in vitro*-Zellreihen aus neonatalen kardialen Rattenfibroblasten zeigte sich eine Induktion der Fibronectin-Proteinexpression durch AngII- und CTGF-Behandlung. Diese Effekte wurden mittels Präinkubation mit b-aminopropionitril, einem LOX spezifischen small molecule inhibitor, vollständig unterdrückt. Diese Daten erlauben also Rückschlüsse auf eine Regulation des Fibronectin-Gehalts via Rac1, CTGF und LOX.

Die Gesamtheit der Beobachtungen geht einher mit den Ergebnissen von Sivakumar et al. bezüglich kardialen Remodeling. Das Auftreten einer dilatativen Kardiomyopathie korreliert hier mit dem Gehalt an Kollagen, LOX und TGF- $\beta$  [144]. Außerdem scheinen ähnliche profibrotische Effekte in vaskulären Zellen zu existieren. Auch hier vermag AngII über den AT1-Rezeptor eine CTGF-Mediation zu provozieren, welche mit einer endogenen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und TGF- $\beta$  assoziiert ist [129].

Die Systematisierung dieser Ergebnisse erfolgte schließlich in Form einer schematischen Signaltransduktionskette unter Berücksichtigung sämtlicher Interaktionen und modulierenden Faktoren (Abbildung 20). Hierbei ergaben sich Inkongruenzen mit den Resultaten von Hong HH et al., die eine Kollagenakkumulation durch humane Gingiva Fibroblasten zwar ebenfalls als TGF- $\beta$ 1-vermittelt ansehen, die nachfolgende CTGF- und LOX-Aktivierung aber als voneinander unabhängige Signalwege beschreiben [66]. Lopez B et al unterscheiden außerdem zwischen einer TGF- $\beta$ - und einer ROS-getriggerten LOX-Aktivitätssteigerung ohne gegenseitige Einflussnahme [93].

## 5.4. Verifizierung der Ergebnisse *in vivo*

Reduzierte Funktionalität resultiert aus dem atrialen strukturellen Remodeling, welches mit Vorhofflimmern einhergeht [4;172].

Richtungsweisende Erkenntnisse über die entsprechenden molekularen Abläufe lieferten bereits unsere Zellkulturergebnisse. Zur Verifizierung dieser Daten und zur Erprobung therapeutischer Ansätze führten wir *in vivo*-Untersuchungen an einem transgenen Maus-Modell durch, welches die einzelnen Moleküle in ihrer Relation zur Rac1-GTPase weiter charakterisieren sollte. Die Tiere zeichneten sich durch eine Überexpression von Rac1 unter der Kontrolle des MHC Promoters aus, was zu einem entsprechend erhöhten CTGF-Gewebegehalt führt und Vorhofflimmern provoziert [1;2]. Eine gesteigerte LOX-Proteinexpression in den RacET-Mäusen konnte durch unsere Analysen ebenso nachgewiesen werden, wie die Assoziation mit einem vermehrten Kollagengehalt und einer Anreicherung von Kollagen-Crosslinks. Auch wurden Auswirkungen der genetischen Modifikation auf den Fibronektin-Zellgehalt festgestellt, der unter der permanenten Rac1-Stimulation einen signifikanten Anstieg erfuhr. Der Nachweis einer gesteigerten Fibronektin-Proteinexpression in linken Vorhöfen von Patienten mit Vorhofflimmern und solchen aus RacET-Mäusen decken sich mit Studien ähnlichen Charakters, in denen die Rhythmusstörung, durch externes Tachypacing, in Tiermodellen imitiert wurde [19;91].

Diese Entschlüsselung zellmetabolischer Faktoren liefert in der Folge Ansatzpunkte für eine möglicherweise präventive Therapie von Vorhofflimmern. Durch rechtzeitige Intervention könnten so die strukturellen Remodelingprozesse inhibiert werden und deren Auswirkungen auf die Persistenz der Rhythmusstörung würden minimiert.

## 5.5. Krankheitsprävention und potentielle Therapieoptionen

Ein weiterer Aspekt unserer Untersuchungen stellt die Identifizierung einer Substanzklasse dar, welche das Auftreten von Vorhofflimmern reduziert. Die erstellte Signaltransduktionskette offeriert, in Form von Regulatorproteinen, mögliche Angriffspunkte für eine medikamentöse Beeinflussung der Rhythmusstörung. Die bisherigen Therapiemöglichkeiten einer Rhythmus- bzw. Frequenzkontrolle erfüllen oft nur unzureichend die erhofften Behandlungserfolge im Hinblick auf Morbidität und Mortalität. Außerdem erfolgt ihre Einleitung erst nach Erstmanifestation der Erkrankung. Primärpräventive Maßnahmen dagegen haben bislang wenig Einzug in den klinischen Alltag erfahren. Die ARMYDA-3-Studie eruierte diesbezüglich den Effekt einer medikamentösen Therapie mit Statinen (HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren) auf die Prävalenz von Vorhofflimmern nach kardiochirurgischen Eingriffen. Die Applikation von 40mg/Tag, beginnend eine Woche vor OP-Termin, ging mit einer 61%igen Risikoreduktion von postoperativem Vorhofflimmern einher [116]. Des Weiteren zeigt die Rekurrenz der Rhythmusstörung nach Kardioversion eine Abhängigkeit von einer Statin-Behandlung [112]. Neben dem Primäreffekt einer Cholesterinsenkung, vermögen HMG-CoA-Reduktase-Hemmer die Isoprenylierung der kleinen G-Proteine zu verhindern und somit auch die Rac1-Aktivität zu inhibieren [31;83;151]. Eine orale Applikation von Statinen an die RacET-Mäuse war mit einer niedrigeren Inzidenz von Vorhofflimmern assoziiert [1;2]. Gleichzeitig kam es zur Regression der LOX-Expression, zur Minderung des Kollagen-Gehalts und zur Dezimierung der Kollagen-Crosslinks in den RacET-Mäusen. Und auch der Fibronektin-Zellgehalt wurde in den transgenen Mäusen unter Statin-Einnahme signifikant reduziert. Die Induktion der LOX-Herabregulierung mittels HMG-CoA-Reduktasehemmern konfirmieren die Analysen von Rodriguez C et al. im porcinen Tiermodell [125]. Bestätigung finden unsere Daten außerdem in den Studien von Ruperez et al., die eine Reduktion der AngII-getriggerten ECM-Synthesesteigerung mittels Statin-Behandlung *in vivo* und *in vitro* beobachteten [130]. Ebenso postulieren Tsai CT et al. die Umkehr des AngII-induzierten strukturellen Vorhofremodelings durch Statine [156].



Auch prospektive Studien an Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen, die eine orale Statin-Therapie erhielten, zeigten eine rechtsatriale Aktivitätsminderung der NADPH-Oxidase durch Inhibition von Rac1. Diese Beobachtungen postulieren eine relevante Übertragung der antioxidativen Effekte der Statine vom Maus-Modell auf den Menschen [97].

Die Statin-Therapie scheint eine mögliche Behandlungsstrategie mit positiven Auswirkungen auf Morbidität und Mortalität in der Prävention von Vorhofflimmern darzustellen. Das Spektrum unerwünschter Arzneimittelwirkungen gilt es natürlich bei der Medikamentenzulassung für neue Indikationen stets zu berücksichtigen. Durch die bereits mehrjährige Anwendung von Statinen im klinischen Alltag ist allerdings ein Nebenwirkungsprofil erstellt und eine Symptomerkennung gewährleistet.

Die Identifikation der Patientengruppe, welche tatsächlich von einer solchen Behandlung profitiert, sollte Ziel künftiger Forschungsarbeiten sein. Der Benefit in der ARMYDA-3-Studie bezog sich primär auf Patienten mit unveränderter Vorhofgröße. Diese Beobachtung deckt sich mit unseren Ergebnissen. Die Vorhöfe unserer Tiere waren zum Untersuchungszeitpunkt nur sehr geringgradig vergrößert. Dieser wurde nämlich vor Erreichen des Endpunktes „Erstmanifestation des Vorhofflimmerns“ terminiert, also in der Reifungsperiode der strukturellen molekularbiologischen Aberrationen. So konnten Aussagen über die Initiierungsphase der Tachyarrhythmie getroffen werden, in der allerdings die Provokation der atrialen Gewebedilatation erst induziert wurde, nicht aber bereits bestand. Eine Behandlung reduzierte nachweislich die Synthese von Kollagenfibrillen und deren Quervernetzung, welche maßgeblich an der atrialen Maladaptation beteiligt sind. Haben sich die strukturellen Remodelingprozesse aber bereits, in Form eines linksatrialen Volumenzuwachses oder einer Permanenz des Vorhofflimmerns, manifestiert, scheint die Ansprechbarkeit des Gewebes deutlich reduziert [116;143]. So haben Patienten mit Vorhofflimmern und gleichzeitiger Vergrößerung des linken Atriums eine nachweislich schlechtere kardiovaskuläre Prognose als solche mit regelrechten Vorhofdimensionen [7]. Auch exakte Angaben zu Dosis und Dauer der Behandlung bedürfen weiterer prospektiver klinischer Analysen.

Die Präsentation des Transduktionsweges mit Darstellung der beteiligten Metaboliten liefert zudem weitere Angriffspunkte für innovative Präventions- und Therapieoptionen von Vorhofflimmern. Die Inhibierung der AngII-induzierten Signalübertragung vermag nämlich, neben der erwiesenen Rac1-Hemmung durch Statine, auch auf sämtlichen anderen Stufen der Kette erreicht zu werden. Diesen Möglichkeiten gilt es weiterhin nachzugehen. So verhindert beispielsweise die vorherrschende Unklarheit über die Tertiärstruktur der Lysyl Oxidase bislang die pharmakologische Entwicklung spezifischer Inhibitoren. Diesbezügliche Konkretisierungen würden dementsprechend auch gleichzeitig die Erweiterung therapeutischer Angriffspunkte beinhalten. Außerdem scheinen insbesondere die Veränderungen durch eine pharmakologische Therapie mit AT1-Rezeptor-Antagonisten oder spezifischen TGFβ1-Rezeptor-Antagonisten



erfolgsversprechend zu sein [60;128;152;156]. Besonders im Hinblick auf vaskuläre Komplikationen, wie den zerebralen Insult, scheint die AT1-Blockade, durch Prävention der atrialen endokardialen Dysfunktion, erfolgsversprechend [173].

## 5.6. Limitationen der Studie

Bezugnehmend auf das angewandte Zellkulturmodell erfahren unsere Investigationen bestimmte Restriktionen. Das Versuchsdesign nutzt nämlich ventrikuläre Fibroblasten als Untersuchungsmaterial, obwohl eine Vorhofpathologie charakterisiert werden soll. Diese Einschränkung ergibt sich aus der niedrigen Quantität atrialen Gewebes bei Nutzung neonataler Ratten als Versuchstiere. Die Anzahl dieser würde sich, unter Begrenzung der Zellen auf solche atrialen Ursprungs, mehrfach potenzieren, da ein Pooling von mindestens zehn Proben erforderlich wäre, um die nötige Gewebemasse für die nachfolgenden Analysen zu erhalten. Deswegen führten wir zu Beginn der Forschungsreihe beispielhaft Experimente durch, die die Validität des Modells prüfen sollten. Unter Berücksichtigung der gleichen Methodik wie im verwendeten Studiendesign, isolierten, kultivierten und stimulierten wir neonatale Rattenfibroblasten aus Vorhofmyokard und detektierten den LOX-mRNA-Gehalt nach Behandlung mit rekombinantem CTGF mittels RT-PCR. Das Ausmaß der LOX-mRNA-Expressionszunahme unter CTGF-Behandlung zeigte sich hierbei als identisch mit der Amplitude der mRNA-Gehaltssteigerung von LOX bei der Utilisation von ventrikulärem Zellmaterial. Diese Beobachtung initiierte die Annahme der Existenz eines einheitlichen Signaltransduktionssystems für atriales und ventrikuläres Myokard, was wir als Grundlage aller folgenden Analysen voraussetzten. Zudem wird Vorhofgewebe, im Vergleich zu solchem aus der Herzkammer, eine deutlich höhere Vulnerabilität bezüglich profibrotischer Remodelingprozesse zugesprochen [58]. Ventrikuläre Effekte dürften somit in zumindest gleichem Ausmaß auf die Vorhofebene übertragbar sein.

Einer eingeschränkten Kongruenz bei der Übertragung der postulierten Signalkette aus dem Ratten-Zellkulturmodells auf die *in-vivo*-Versuche mit Mäusen konnte durch mehrfache Annahmeprüfung auf verschiedenen Ebenen des Signaltransduktionsweges entgegengewirkt werden. So unterlagen sowohl die kardiale LOX-, als auch die CTGF-Proteinexpression der Mäuse der eindeutigen Regulation durch die Rac1-GTPase und wurden statininduzierend supprimiert, was eine alternative Wirkweise der HMG-CoA-Reduktasehemmer unter Umgehung des beschriebenen Signalweges unwahrscheinlich macht. Außerdem erhöht die

Tatsache, dass der gleiche Signalweg in verschiedenen Spezies existent zu sein scheint, die Wahrscheinlichkeit der Gültigkeit auch für humane Individuen.

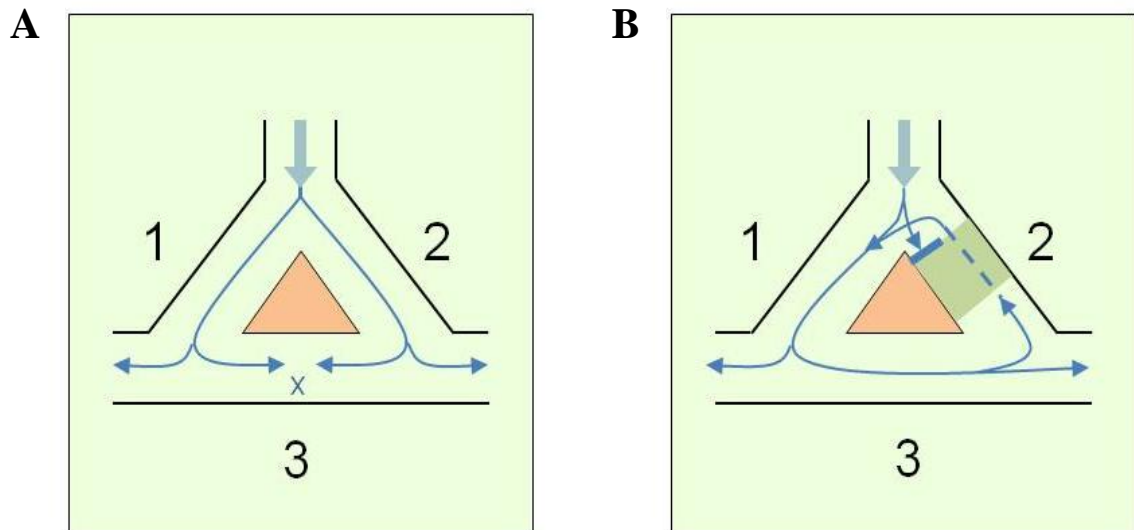
## 5.7. Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Forschungsreihe zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen im Rahmen von Vorhofflimmern beiträgt und diesbezüglich sowohl ätiologische, als auch therapeutische Konzepte und Erklärungsmodelle präsentiert.

Die Identifizierung des Signalwegs, welcher mit strukturellem Vorhofremodeling assoziiert ist, bildet die Grundlage zur Entwicklung neuartiger präventiv wirksamer Behandlungsstrategien. Weitere klinische Studien sind nötig, um die Wirksamkeit einer Statineinnahme auf die Prävalenz der Erkrankung zu überprüfen. Der Einsatz dieser Medikamentenklasse gestaltet sich jedenfalls als realitätsnah und zur praktischen Umsetzung geeignet; auch wenn die beschriebenen Effekte keiner kardialen Spezifität unterliegen.

## 6. Abbildungsverzeichnis

### Abbildung 1

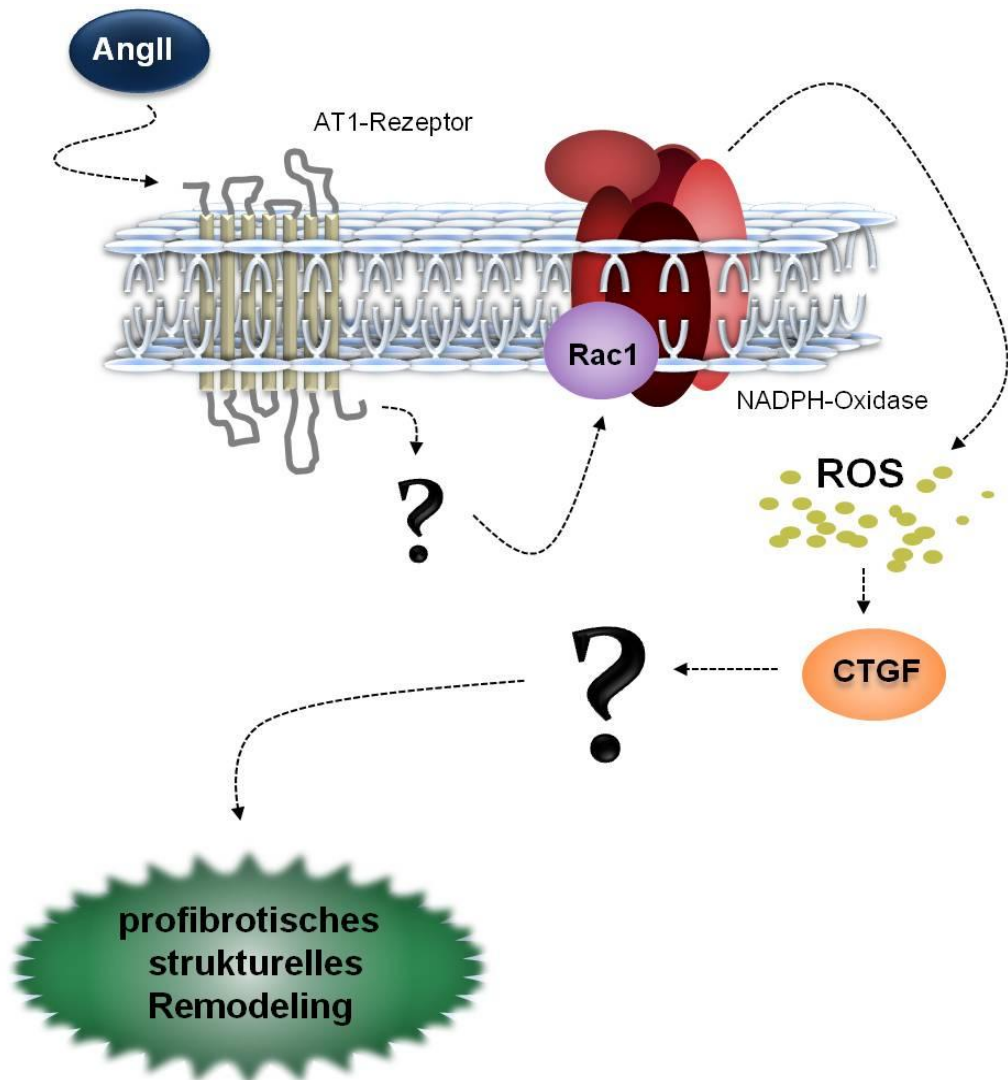


#### Elektrophysiologie im Rahmen des strukturellen Remodelings im Vorhofmyokard

**A:** Regelrechtes Vorhofmyokard: Die Ausbreitung des Aktionspotentials erfolgt gleichermaßen entlang den Leitungsbahnen 1 und 2 einer sich verzweigenden Muskelfaser. Ein retrograder Verlauf ist wegen der Refraktärzeit der Muskelzelle ausgeschlossen. Die sich entgegenlaufenden Erregungen in einer Kurzschlussverbindung der beiden Muskelfaserstränge (3) löschen sich gegenseitig aus (x) und garantieren so eine gerichtete orthograde Depolarisationswelle (Abbildung modifiziert aus [174]).

**B:** Unidirektionaler Block und Reentry-Genese: Entsprechend einer reaktiven Fibrosierung, ist die Leitfähigkeit des Myokards im betroffenen Areal herabgesetzt (grün). Außerdem erlaubt die Strukturänderung lediglich eine retrograde Ausbreitung der Erregung; der orthograde Weg ist blockiert. Ein ankommendes Aktionspotential wird also ausschließlich über Leitungsbahn 1 weitergeleitet. In Verbindungsbahn 3 erfolgt nun, aufgrund der fehlenden gegenläufigen Erregungswelle, eine gerichtete Erregungsausbreitung, welche schließlich retrograd Leitungsbahn 2 depolarisiert. Die Unidirektionalität des fibrosierten Areals ermöglicht eine weitere Fortleitung des Signals, verzögert dieses aber wegen der veränderten Zellkomposition (----). Diese zeitliche Diskrepanz ermöglicht das Umgehen der Refraktärzeit im übrigen Myokard, da durch die Abbremsung der Erregung ausreichend Repolarisationszeitraum gewonnen wurde. Sobald das Aktionspotential den Block also passiert hat, vermag es bereits die Muskelfasern in Leitungsbahn 1 erneut zu depolarisieren. Demnach wird ein kontinuierlicher Kreislauf in Form eines Reentrys geschaffen, welcher ohne äußeren Einfluss nicht wieder zu überwinden ist (Abbildung modifiziert aus [174]).

## Abbildung 2

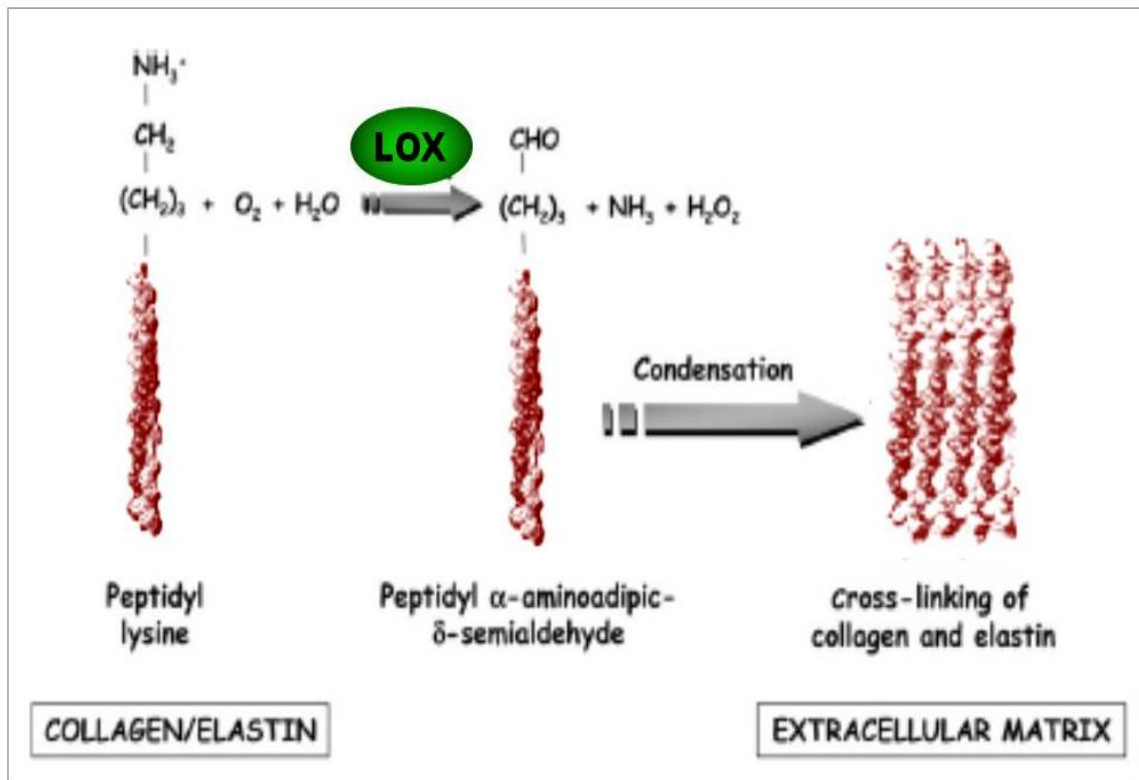


### Offene Fragen zur AngII-getriggerten Reizweiterleitung im atrialen Myokard unter Vorhofflimmern

Die Manifestation und Unterhaltung von Vorhofflimmern gründet sich auf strukturelle Remodelingprozesse, welche durch AngII induziert werden. Die Rac1-abhängige NADPH-Oxidase wird aktiviert und akkumuliert in der Folge Superoxide, die über eine Anregung der CTGF-Produktion fibroproliferativ wirksam werden. Der genaue Ablauf dieser profibrotischen Antwort auf das CTGF-Signal konnte allerdings bislang noch nicht identifiziert werden. Es fehlt der unmittelbare Initiator der Kompositionsänderung extrazellulärer Matrixproteine. In diesem Zusammenhang charakterisierten wir die Bedeutung der Lysyl Oxidase, welche über eine Vernetzung von Kollagenfibrillen fibroseinduzierendes Potenzial besitzt.

Unklarheit besteht des Weiteren in der Übertragung des AngII-Reizes von seinem membranständigen Rezeptor auf die zytosolische Rac1-GTPase. Hier vermuteten wir eine Rolle von TGF- $\beta$ 1, welches als fibrogenetisches Zytokin bekannt ist.

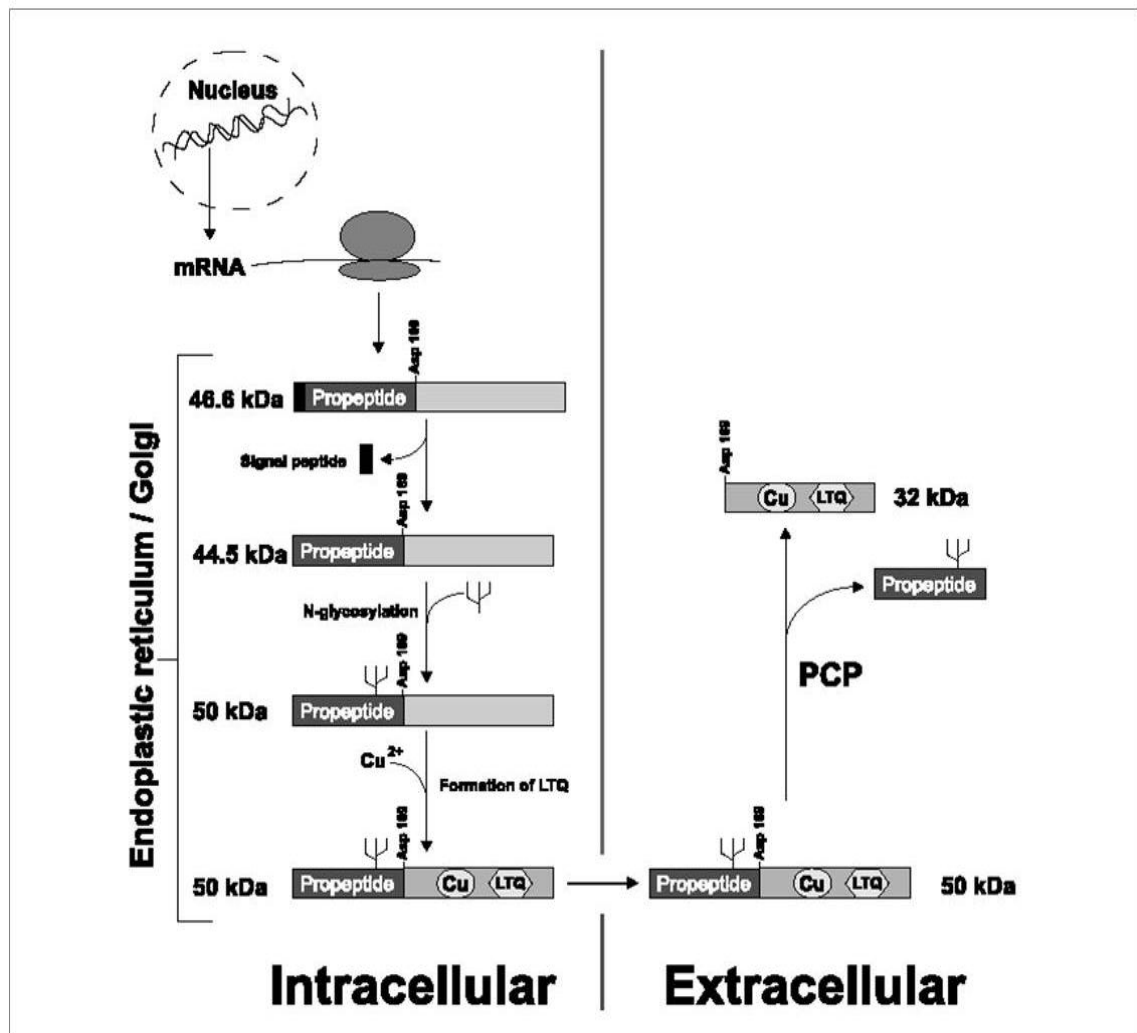
## Abbildung 3



### Das LOX-katalysierte Crosslinking der Kollagenfibrillen

Die Stöchiometrie der Reaktion, welche LOX katalysiert, veranschaulicht die Entstehung eines reaktionsfreudigen Semialdehyds durch Oxidation primärer Amine, die den Peptidsträngen von Kollagen und Elastin entstammen. Dieses Produkt ist befähigt spontane Bindungen mit einem Peptidyl Lysin oder einem Peptidyl Aldehyd eines weiteren Stranges einzugehen,. Die Kondensation ergibt kovalente Crosslinks zwischen den einzelnen Fibrillen und dient deren Verknüpfung zur Stabilitätssteigerung des Gewebes (Abbildung aus [97]).

## Abbildung 4

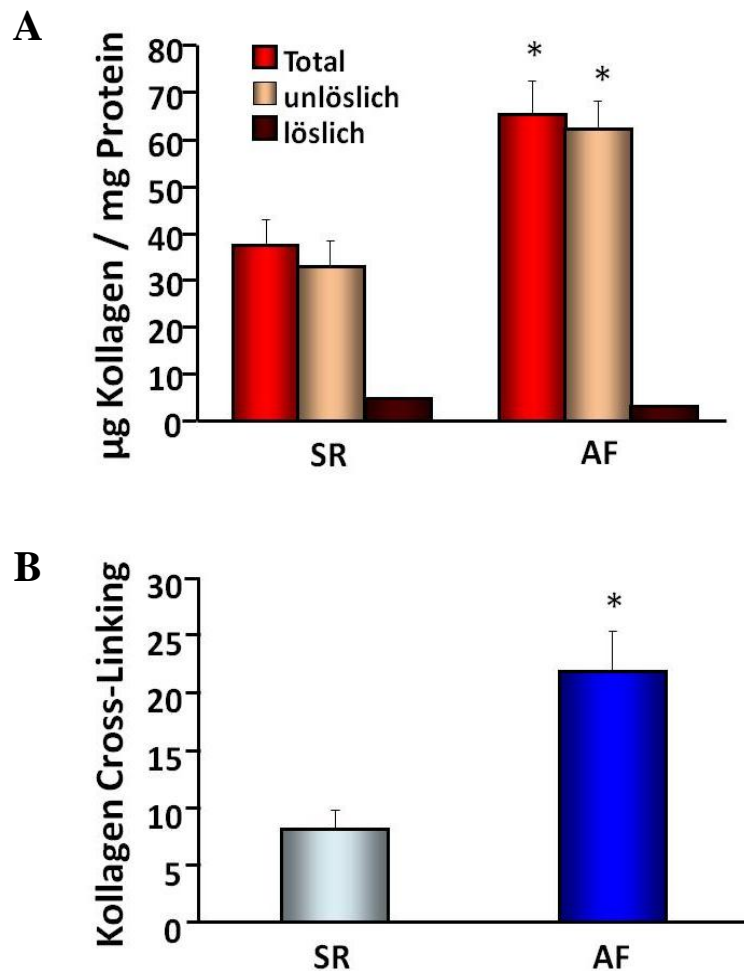


### Biosynthese und Regulationsmöglichkeiten der Lysyl Oxidase

Der LOX-Syntheseweg beinhaltet eine Verlagerung von intra- nach extrazellulär, wo schließlich, durch proteolytische Abspaltung des Propeptids, das Enzym aktiviert wird. Um seine auto- und parakrinen Effekte zu erfüllen, wird es anschließend entweder erneut in die Zelle aufgenommen oder verbleibt im Interstitium (Abbildung aus [75]).

## Abbildung 5

### Menschlicher linker Vorhof



### Gesteigerter Kollagengehalt und vermehrtes Crosslinking der Kollagenfibrillen in linksatrialen Appendices bei Patienten mit Vorhofflimmern

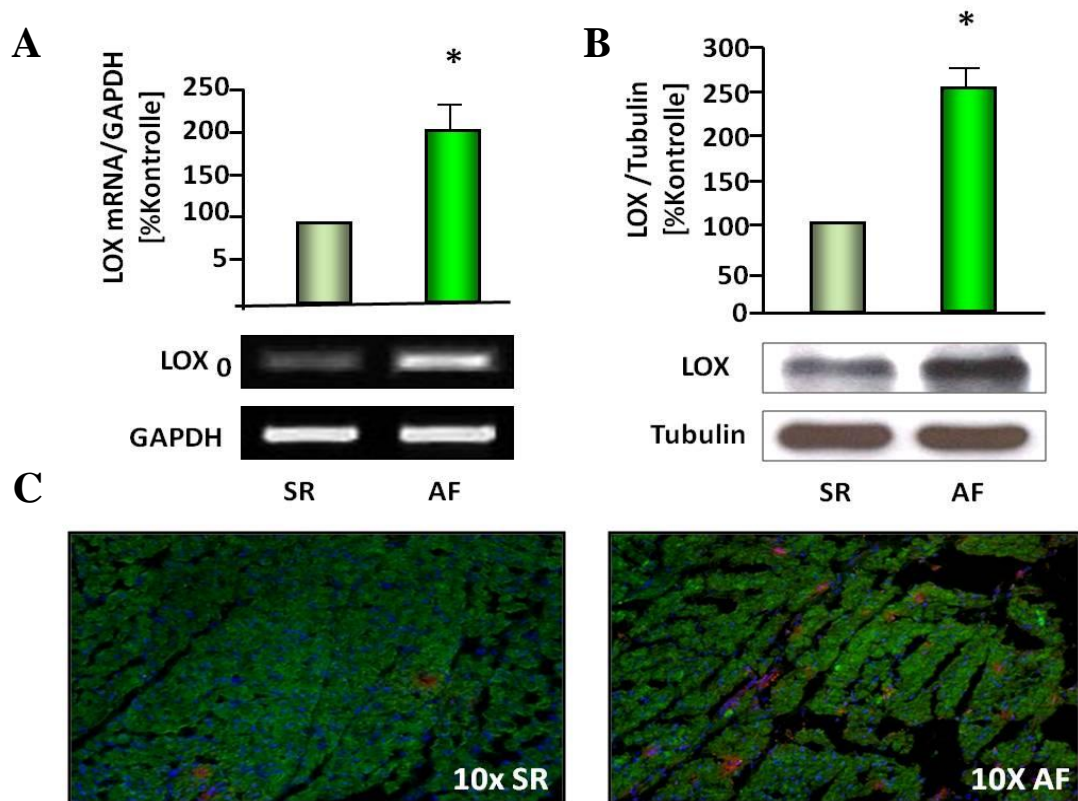
**A:** Die Quantifizierung von löslichem, unlöslichem und gesamtem Kollagengehalt in linken Vorhöfen von Patienten mit Vorhofflimmern (AF) ergab, im Vergleich zu Kontrollproben im Sinusrhythmus (SR), einen erhöhten Kollagen-Gesamtgehalt ( $n=5$ ,  $65 \pm 7$  vs.  $37 \pm 5$  µg/mg Protein,  $p < 0,05$ ), sowie eine Steigerung des Gehalts an unlöslichem Kollagen (=cross-linked Kollagen) ( $n=5$ ,  $62 \pm 6$  vs.  $32 \pm 5$  µg/mg Protein,  $p < 0,05$ ). Dagegen blieb die Menge an löslichem Kollagen (=nicht cross-linked Kollagen) in beiden Vergleichsgruppen nahezu konstant.

**B:** Die Menge an Kollagen-Crosslinks ergibt sich aus dem Verhältnis von unlöslichem zu löslichem Kollagengehalt und zeigt in der densitometrischen Quantifizierung eine Vermehrung in linken Vorhöfen bei Patienten mit Vorhofflimmern, verglichen mit solchen von Patienten im Sinusrhythmus ( $n=5$ ,  $21 \pm 4$  vs.  $8 \pm 2$ ,  $p < 0,05$ ).



## Abbildung 6

### Menschlicher linker Vorhof



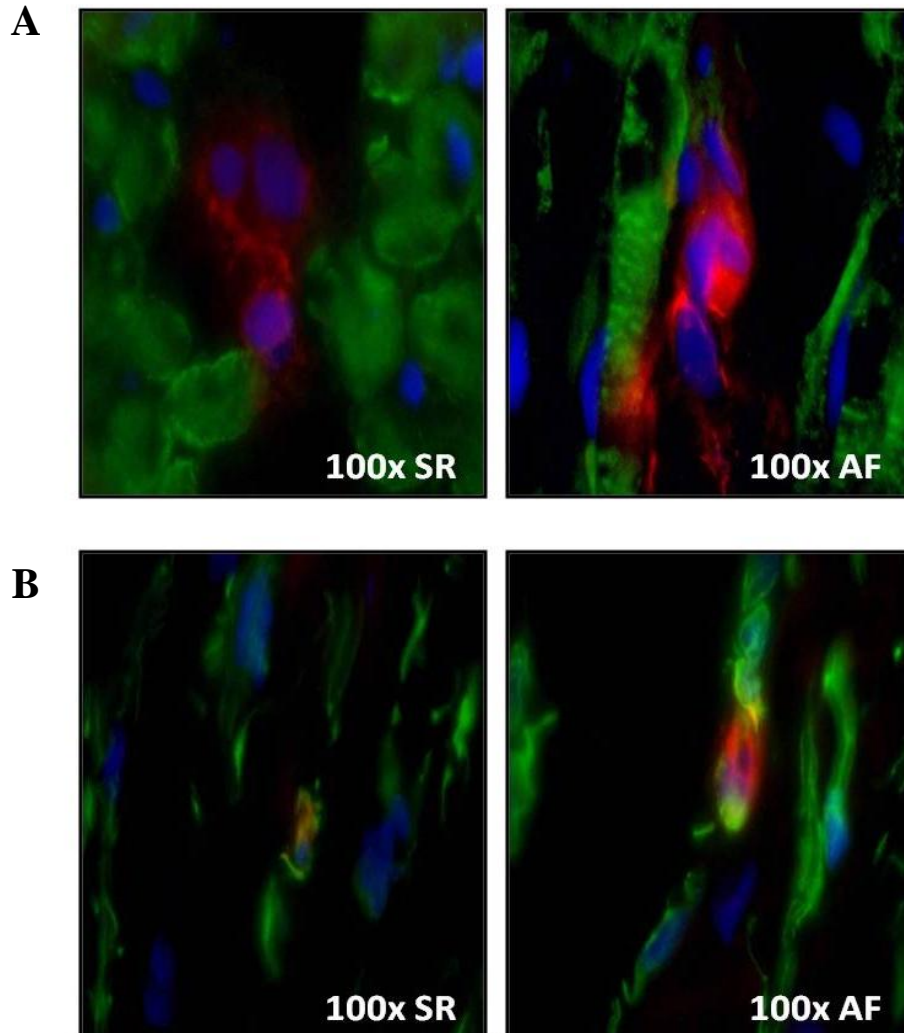
### Erhöhte LOX-Expression in linksatrialen Appendices bei Patienten mit Vorhofflimmern

**A:** Die densitometrische Quantifizierung, normiert auf GAPDH als DNA-Ladekontrolle, zeigte eine signifikante Erhöhung des Gehalts an LOX-mRNA im linken Vorhof von Patienten, die unter Vorhofflimmern litten, im Vergleich zu solchen im Sinusrhythmus ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ). Darunter: repräsentative LOX- RT-PCR verglichen mit entsprechender GAPDH- DNA-Ladekontrolle.

**B:** Die Veränderungen auf mRNA-Ebene, ließen sich mittels Quantifizierung durch Western Blot- Analysen auch auf die Proteinkomposition der atrialen Zellen übertragen. Die linken Vorhöfe von Patienten mit Vorhofflimmern wiesen, verglichen mit solchen im Sinusrhythmus, eine Steigerung des LOX-Proteingehalts auf ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ). Darunter: repräsentativer LOX-Western Blot verglichen mit entsprechender  $\beta$ -Tubulin-Proteinladekontrolle.

**C:** Immunfluoreszenz-Analysen im linksatrialen Vorhofmykard von Patienten mit Vorhofflimmern oder im Sinusrhythmus unterstrichen die bisherigen Beobachtungen: Die Anfärbung des LOX-Proteins (rot), des Myocyten-Markers  $\alpha$ -sarkomerisches Aktin (grün) und der Zellkerne (DAPI blau) ergab bei 10facher Vergrößerung eine deutliche quantitative Diskrepanz des LOX-Proteingehalts in Gewebe mit und ohne die Rhythmusstörung. Die Übersichtsaufnahme zeigt eine Steigerung des LOX-Proteins unter Vorhofflimmern.



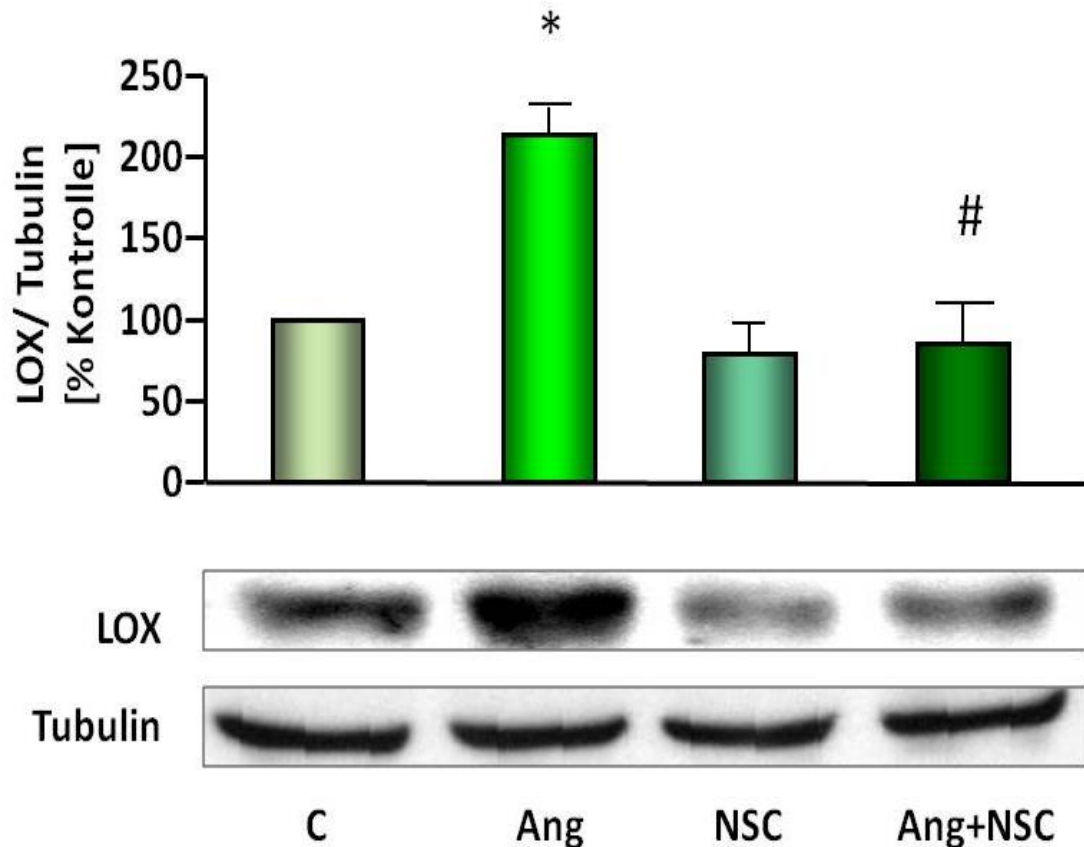
**Abbildung 7****Menschlicher  
linker Vorhof****Intrafibroblastäre Detektion des LOX-Proteins mittels Immunfluoreszenz**

**A:** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen anhand von Lokalisationsanalysen im linksatrialen Vorhofmyokard von Patienten mit Vorhofflimmern bzw. Sinusrhythmus ergaben eine extramyozytäre Anordnung der LOX-Proteine (rot). Die 100fache Vergrößerungsaufnahme zeigt die mit dem spezifischen Marker  $\alpha$ -sarkomerischem Aktin angefärbten Kardiomyozyten (grün) in direkter Nachbarschaft zu den LOX-tragenden Zellen. Zellkerne in DAPI blau.

**B:** Die 100fache repräsentative Vergrößerungsaufnahme der weiterführenden Immunfluoreszenzanalysen im linken Vorhofmyokard von Patienten mit und ohne Vorhofflimmern veranschaulicht die Lokalisation des LOX-Proteins (rot) innerhalb der Fibroblasten, die mittels Fibroblasten-Marker Vimentin angefärbt wurden (grün). Zellkerne in DAPI blau.

## Abbildung 8

### Neonatale kardiale Rattenfibroblasten

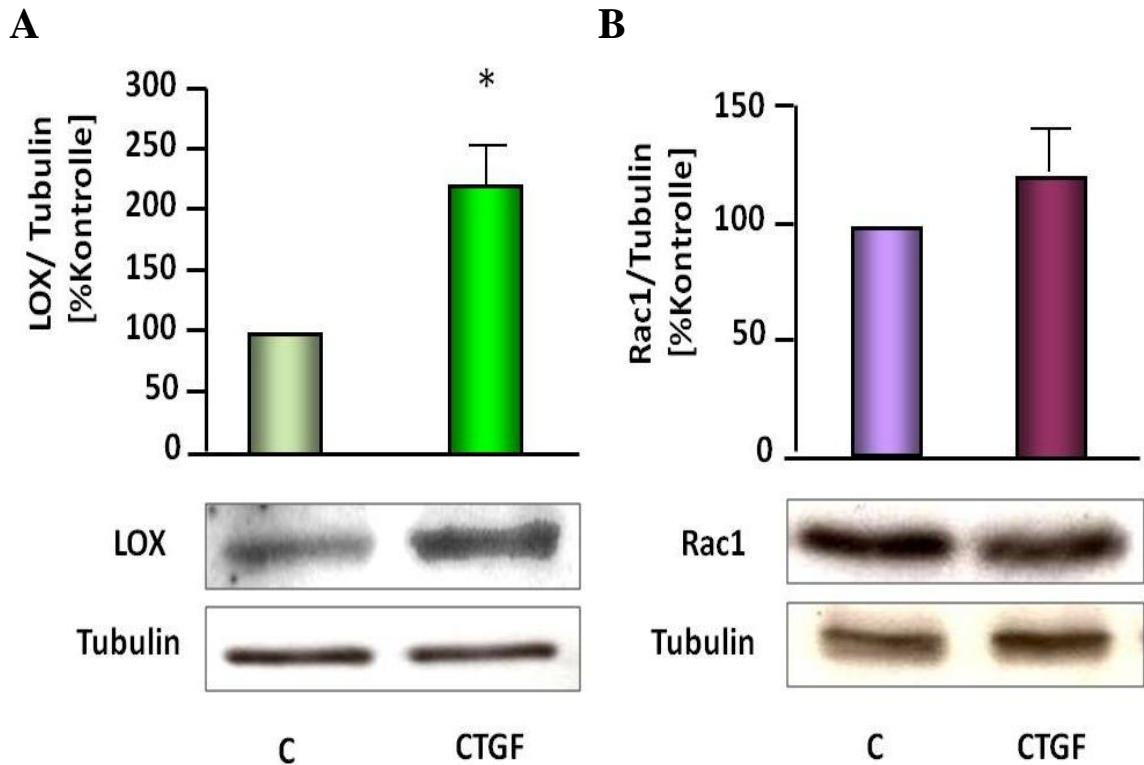


### Rac 1-abhängige Steigerung der LOX-Expression in neonatalen kardialen Fibroblasten durch AngII-Behandlung

Die Behandlung von neonatalen kardialen Rattenfibroblasten mit Ang II ( $1\mu\text{M}$  für 3 Std.), die zuvor mit und ohne den spezifischen Rac1 small molecule inhibitor NSC 23766 präinkubiert wurden ( $100\text{nM}$  für 21 Std.), induzierte eine signifikante Erhöhung der LOX-Expression in der densitometrischen Quantifizierung der Western Blot-Analysen, normiert auf  $\beta$ -Tubulin als Proteinladekontrolle ( $n=5$ ,  $*p<0,05$  vs. Kontrolle (C)). Die Vorbehandlung mit NSC 23766 konnte diesen Effekt vollständig verhindern ( $n=5$ ,  $\#p<0,05$  vs. AngII). Darunter: Repräsentativer LOX-Western Blot verglichen mit entsprechender  $\beta$ -Tubulin-Proteinladekontrolle.

## Abbildung 9

### Neonatale kardiale Rattenfibroblasten

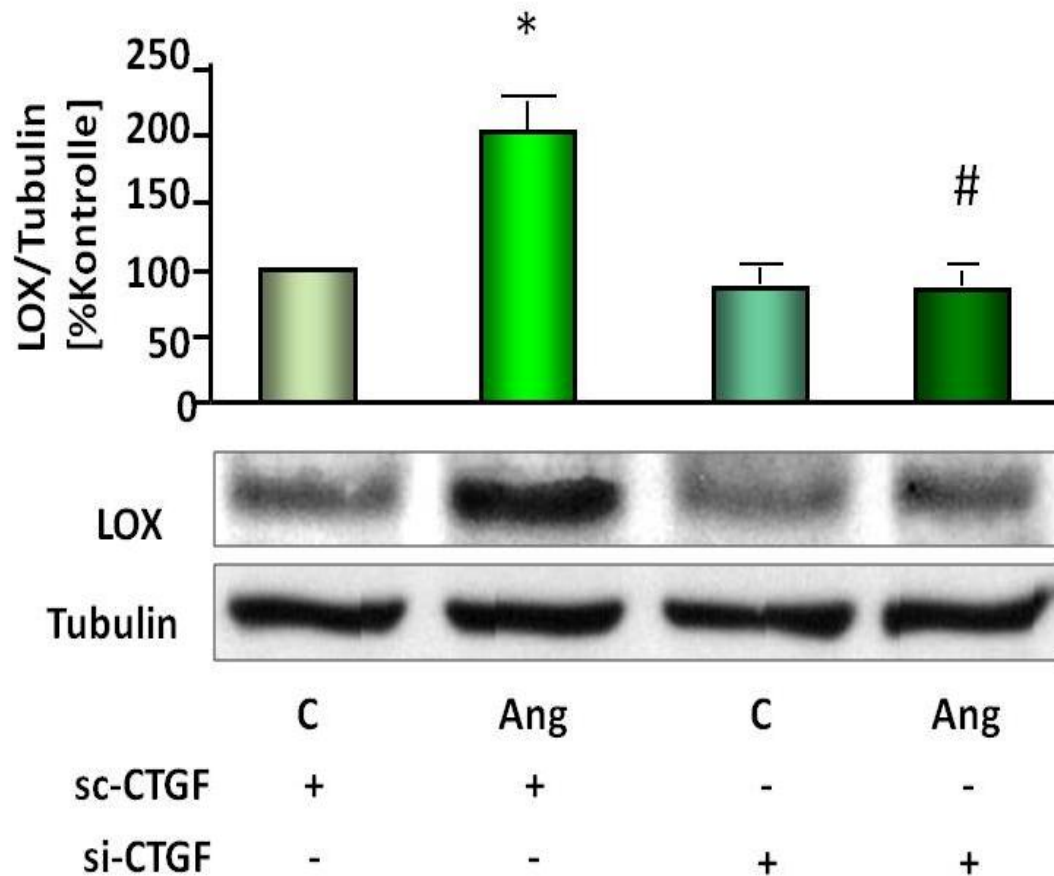


### Abhängigkeit des LOX-Proteingehalts in neonatalen kardialen Rattenfibroblasten von der Aktivität des connective tissue growth factors (CTGF)

**A:** Die Effekte einer Inkubation von neonatalen kardialen Rattenfibroblasten mit rekombinantem connective tissue growth factor (CTGF 1ng/ml für 1 Std.) auf die LOX-Expression ergaben in der densitometrischen Quantifizierung, im Vergleich zu  $\beta$ -Tubulin als Proteinladekontrolle, eine deutliche Zunahme des Protein-Gehalts unter CTGF-Behandlung ( $n=5$ ,  $*p<0,05$  vs. Kontrolle (C)). Darunter: Repräsentativer LOX-Western Blot verglichen mit entsprechender  $\beta$ -Tubulin-Proteinladekontrolle.

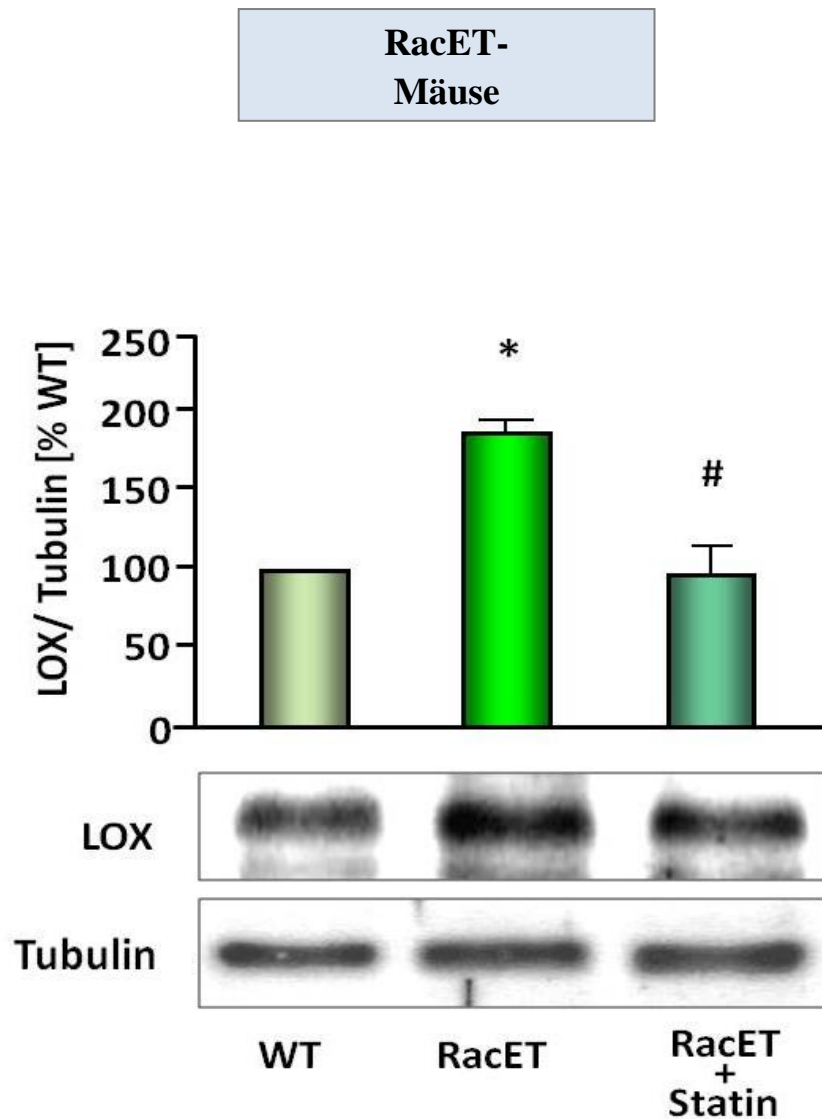
**B:** Eine solche CTGF-Behandlung (1ng/ml für 1 Std.) modulierte dagegen keinesfalls die Expression des Rac 1-Proteins in neonatalen kardialen Rattenfibroblasten. Die Quantifizierungsanalysen, normiert auf  $\beta$ -Tubulin als Proteinladekontrolle, ergaben keine Veränderungen des Rac1-Gehalts unter Behandlung mit rekombinantem connective tissue growth factor. Darunter: Repräsentativer Rac 1-Western Blot verglichen mit entsprechender  $\beta$ -Tubulin-Proteinladekontrolle.

## Abbildung 10

 Neonatale kardiale  
Rattenfibroblasten

**Induktion der LOX-Proteinexpressionssteigerung durch Rac 1 über die vermehrte Synthese von CTGF in neonatalen kardialen Rattenfibroblasten**

Der CTGF-Knockdown in neonatalen kardialen Rattenfibroblasten mittels siRNA-Transfektion (si-CTGF) vermag in der densitometrischen Quantifizierung der Western Blot-Analysen, im Vergleich zu  $\beta$ -Tubulin als Proteinladekontrolle, den beobachteten Effekt einer LOX-Expressionssteigerung durch AngII-Behandlung bei aktivierbarem CTGF (sc-CTGF) ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ) nicht zu erzielen. Vielmehr bleibt eine Behandlung mit AngII (1yM für 3 Std.) ohne Veränderung des LOX-Proteingehalts. Darunter: Repräsentativer LOX-Western Blot verglichen mit entsprechender  $\beta$ -Tubulin-Proteinladekontrolle.

## Abbildung 11

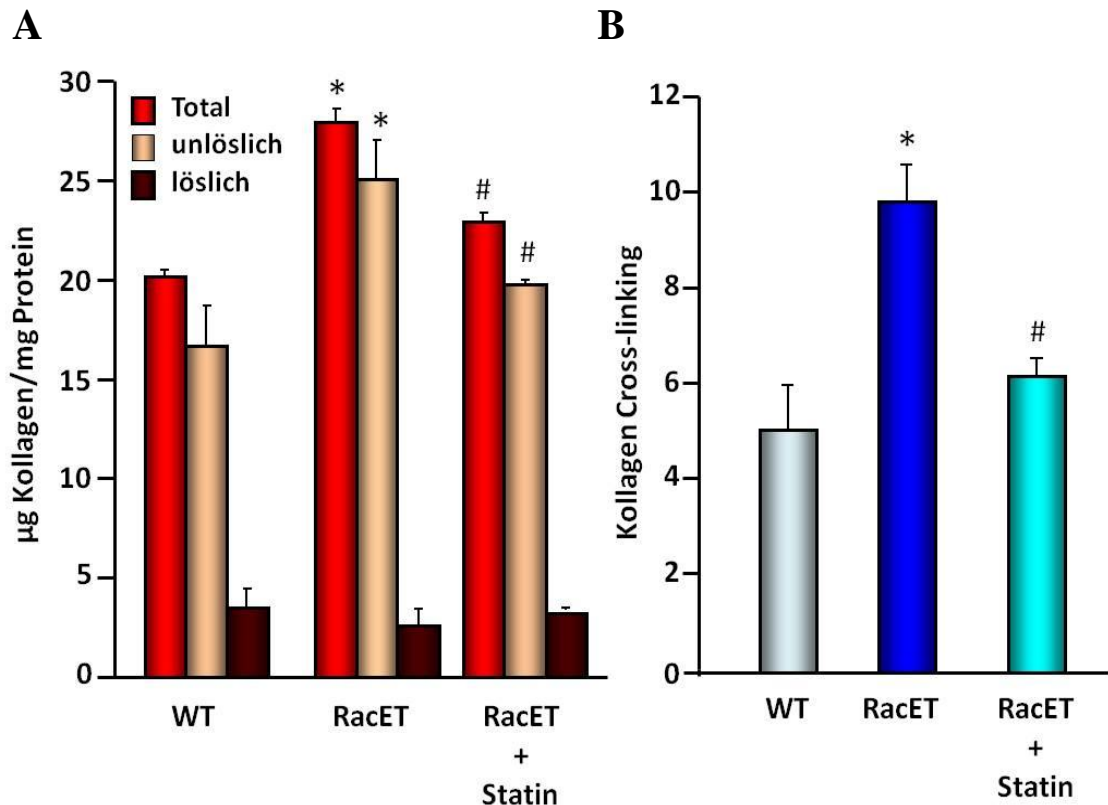


### Reduktion der LOX-Expression durch Statinbehandlung *in vivo*

Transgene Mäuse mit kardialer Überexpression von konstitutiv aktivem (V12) Rac 1, reguliert durch den  $\alpha$ -myosin heavy chain (MHC) promoter, (RacET) wurden einerseits mit Rosuvastatin (0,4mg/Tag p.o.) (RacET+Statin), andererseits mit normalem Futter für 10 Monate behandelt und mit 10 Monate alten Wildtyp-Kontrollen (WT) verglichen. Die Quantifizierungsanalysen des LOX-Proteingehalts, normiert auf  $\beta$ -Tubulin als Proteinladekontrolle, ergaben eine deutliche Expressionssteigerung von LOX in den RacET-Mäusen, verglichen mit den WT-Tieren. Dieser Effekt wurde durch Behandlung mit Rosuvastatin vollständig verhindert (n=5 pro Gruppe, \*p<0,05 vs. WT, #p<0,05 vs. RacET). Darunter: Repräsentativer LOX-Western Blot verglichen mit entsprechender  $\beta$ -Tubulin-Proteinladekontrolle.

## Abbildung 12

### RacET-Mäuse

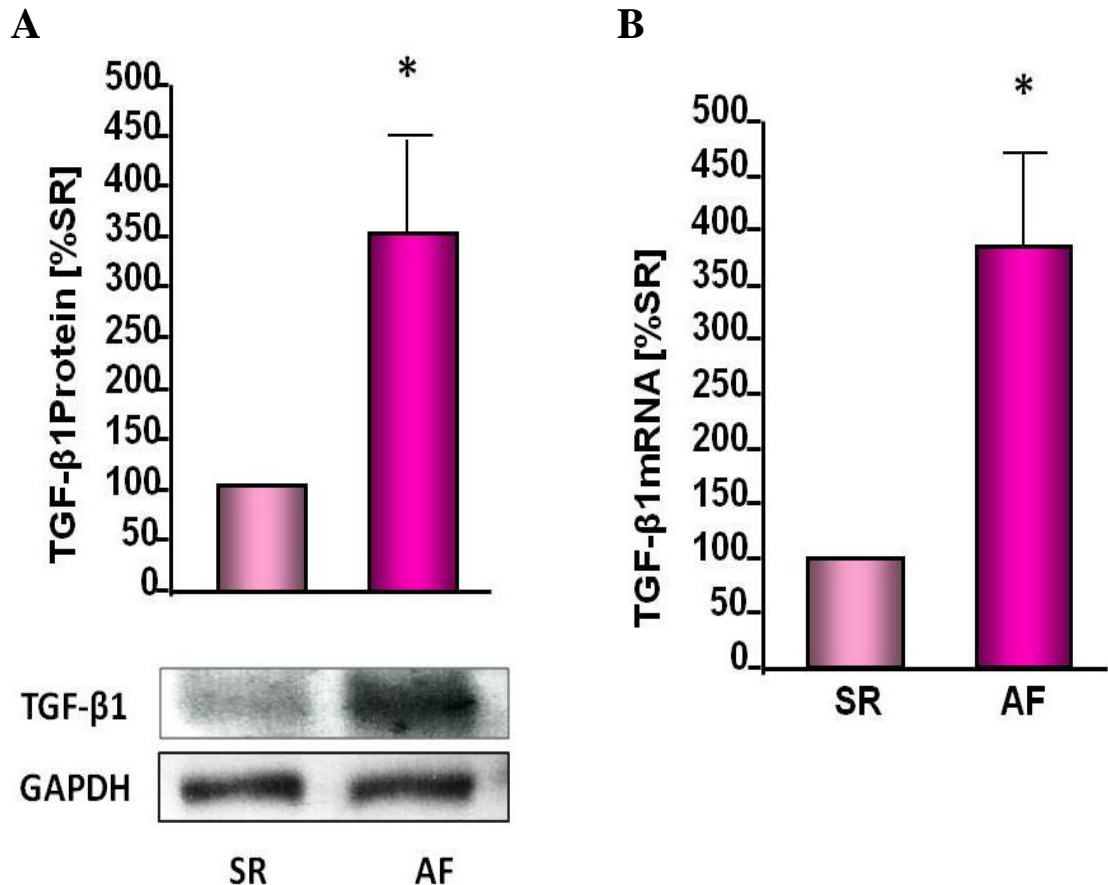


### Reduktion des Kollagen-Gehalts und des Kollagen Crosslinkings durch Statinbehandlung

**A:** Die densitometrische Quantifizierung von löslichem, unlöslichem und gesamtem Kollagengehalt in den RacET-Mäusen ergab, im Vergleich zu den WT-Mäusen, einen erhöhten Kollagen-Gesamtgehalt, sowie eine Steigerung des Gehalts an unlöslichem Kollagen (=cross-linked Kollagen) (n=5 pro Gruppe, \*p<0,05 vs WT). Dagegen blieb die Menge an löslichem Kollagen (=nicht cross-linked Kollagen) in beiden Vergleichsgruppen nahezu konstant. Eine 10-monatige Behandlung mit Rosuvastatin vermochte diesen Effekt zu reduzieren (n=5 pro Gruppe, #p<0,05 vs. RacET).

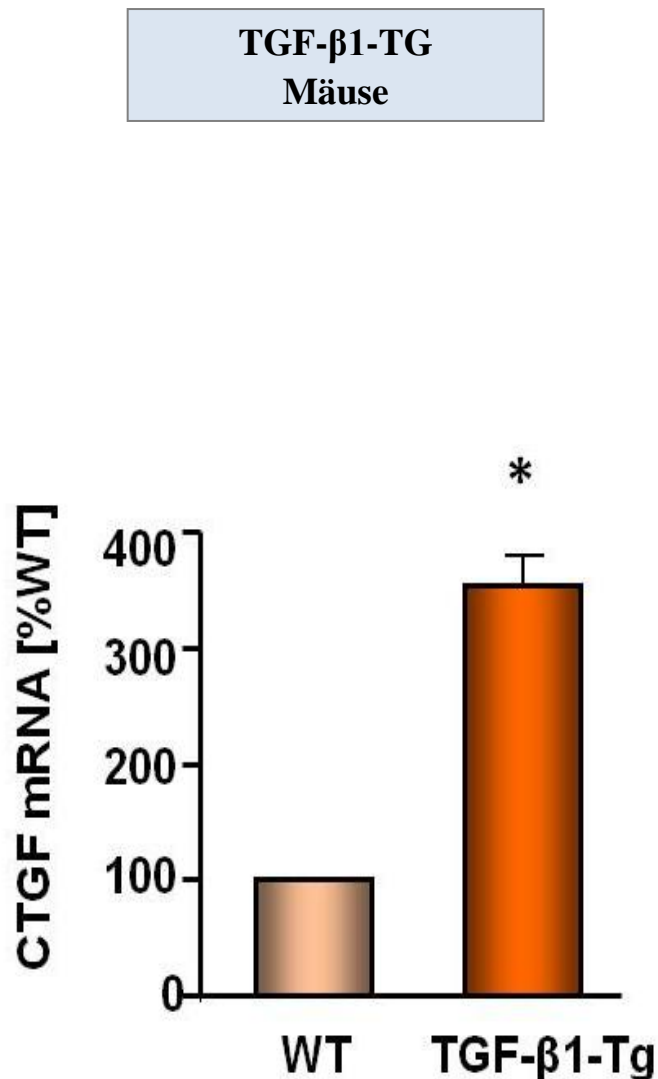
**B:** Die Menge an Kollagen-Crosslinks ergibt sich aus dem Verhältnis von unlöslichem zu löslichem Kollagengehalt und zeigt in der densitometrischen Quantifizierung eine signifikante Vermehrung in den Rac-ET-Mäusen, verglichen mit den WT-Tieren (n=5 pro Gruppe, \*p<0,05 vs. WT). Die Rosuvastatinbehandlung verhinderte diese Zunahme des Crosslinkings der Kollagenfibrillen (n=5, #p<0,05 vs. RacET).

## Abbildung 13

 Menschlicher  
linker Vorhof

**Erhöhter TGF-β1-Gehalt in linksatrialen Herzohren bei Patienten mit Vorhofflimmern**

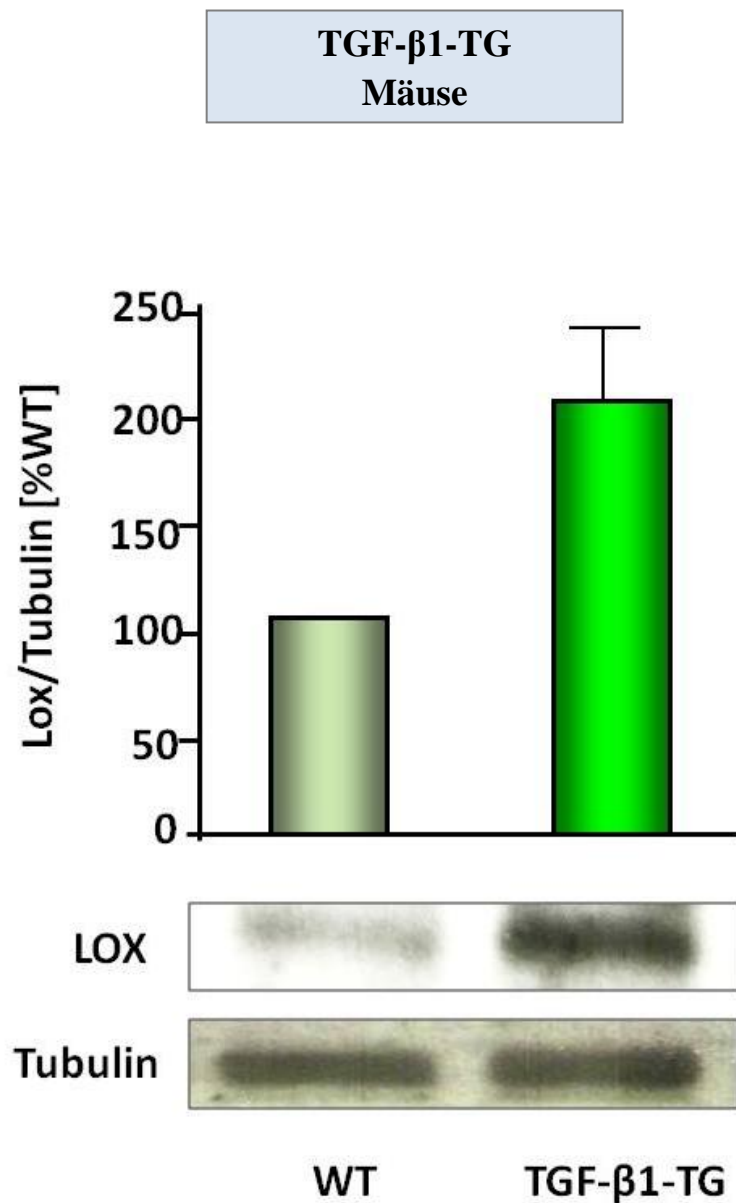
**A:** Mittels densitometrischer Auswertung der TGF-β1-Quantifizierung durch Westen Blot-Analysen, konnte eine deutliche Expressionssteigerung des Cytokins in linken Herzohrproben aus Patienten mit Vorhofflimmern identifiziert werden (n=7,  $p < 0,05$  vs. SR). Darunter: repräsentativer TGF-β1-Western-Blot im Vergleich zur GAPDH-Proteinladekontrolle.

**B:** Auch auf mRNA-Ebene konnte diese Vervielfältigung durch eine Real-Time-PCR detektiert werden und als signifikant bewertet werden (n=5,  $p < 0,05$  vs. SR).

**Abbildung 14****Steigerung der CTGF-Proteinexpression in TGF- $\beta$ 1-überexprimierenden transgenen Mäusen**

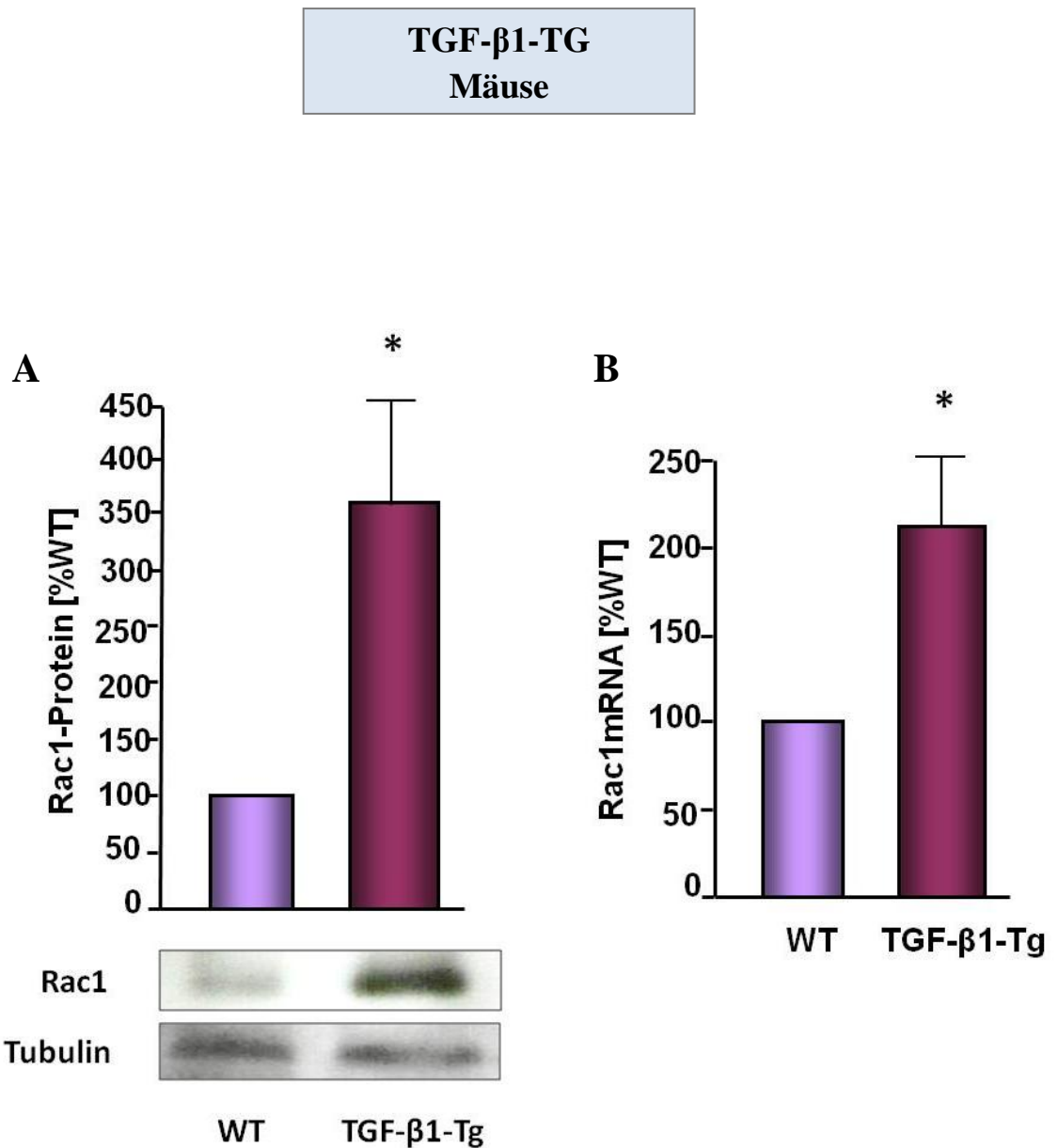
Die Real-Time-PCR-Auswertungen belegten einen signifikanten Anstieg der Proteinexpression des connective tissue growth factors in genetisch veränderten Mäusen mit einer TGF- $\beta$ 1-gesteigerten Proteinbiosynthese im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (n=5; p<0,05). Somit scheint das Zytokin auch auf die molekularbiologischen Interaktionen in der postulierten Signaltransduktionskette einen Einfluss auszuüben.



**Abbildung 15****LOX-Proteinexpressionssteigerung in TGF- $\beta$ 1-TG-Mäusen**

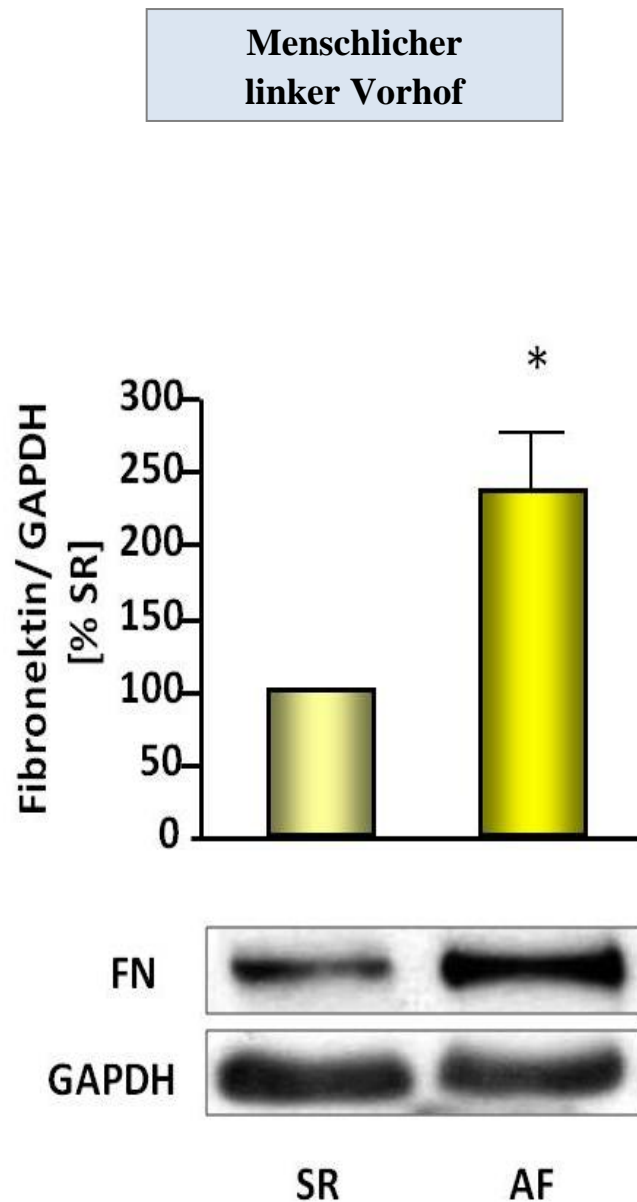
Die densitometrische Quantifizierung der LOX-Proteinmessungen mittels Western Blot-Analyse, ergab eine Zunahme der Expression des Enzyms im Myokard transgener Mäuse, welche hinsichtlich einer konstitutiven Überproduktion von TGF- $\beta$ 1 genetisch modifiziert wurden. Leider wurde das Signifikanzniveau, womöglich wegen zu geringer Stückzahl, nicht erreicht (n=4, p>0,05). Darunter: Repräsentativer LOX-Western Blot, verglichen mit der jeweiligen GAPDH-Proteinladekontrolle.

## Abbildung 16

**Rac1-Protein- und -mRNA-Expression in TGF- $\beta$ 1-TG-Mäusen**

**A:** Die Densitometrie ergab eine gesteigerte Rac1-Proteinexpression in den genetisch modifizierten Tieren im Vergleich zu den Wildtypen (n=4; p<0,05 vs. WT). Darunter: Repräsentativer Western Blot mit Tubulin-Proteinladekontrolle.

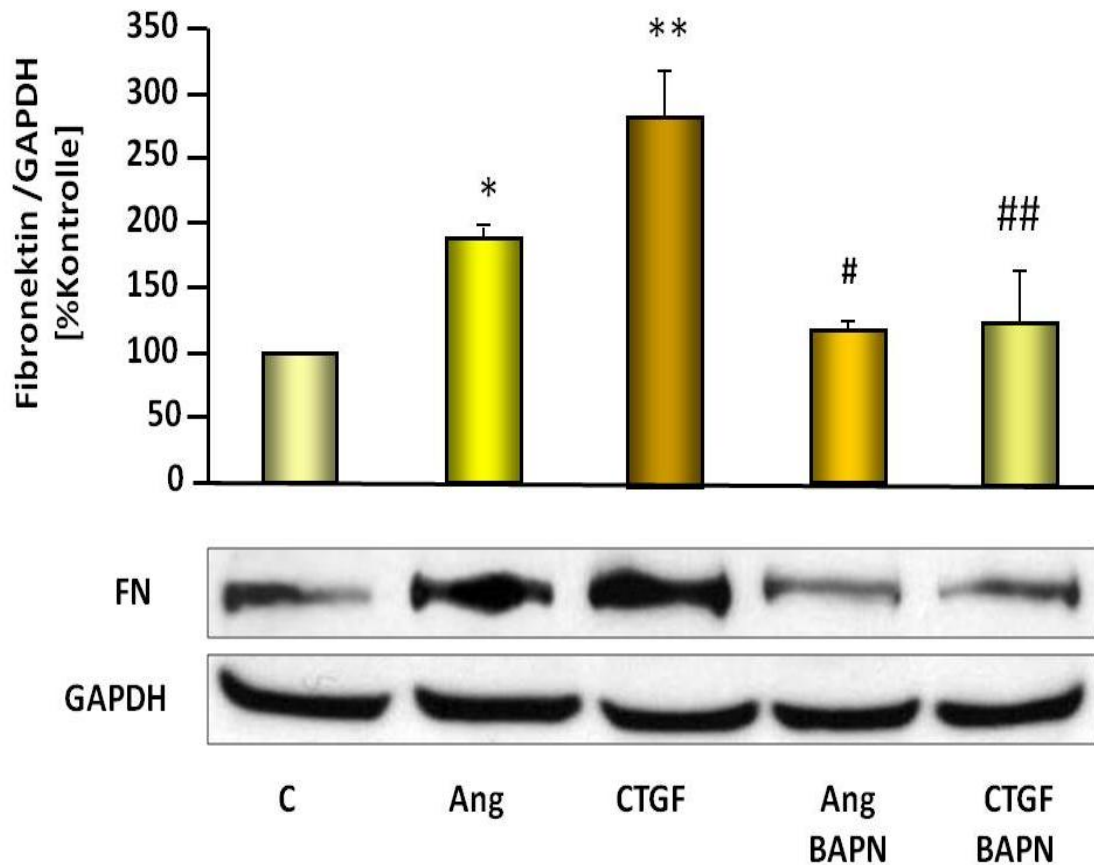
**B:** Betrachtungen auf mRNA-Ebene konnten diesen Effekt bestätigen und mittels Real-Time-PCR quantifiziert werden. Auch hier zeigte sich eine mehr als verdoppelte Expression der Rac1-GTPase in TGF- $\beta$ 1-überexprimierenden Mäusen in Bezug auf ihre genetisch unauffälligen Artgenossen (n=5; p<0,05).

**Abbildung 17****Gesteigerte Fibronectin-Proteinexpression in linksatrialen Appendices bei Patienten mit Vorhofflimmern**

Das linksatriale Vorhofmyokard von Patienten, die unter Vorhofflimmern leiden, ergab in der densitometrischen Quantifizierung, normiert auf GAPDH als Proteinladekontrolle, einen signifikant erhöhten Gehalt des Fibronectin-Proteins, verglichen mit dem des entsprechenden Gewebes eines Patienten im Sinusrhythmus (n=5, \*p<0,05). Darunter: Repräsentativer Fibronectin-Western Blot verglichen mit entsprechender GAPDH-Proteinladekontrolle.

## Abbildung 18

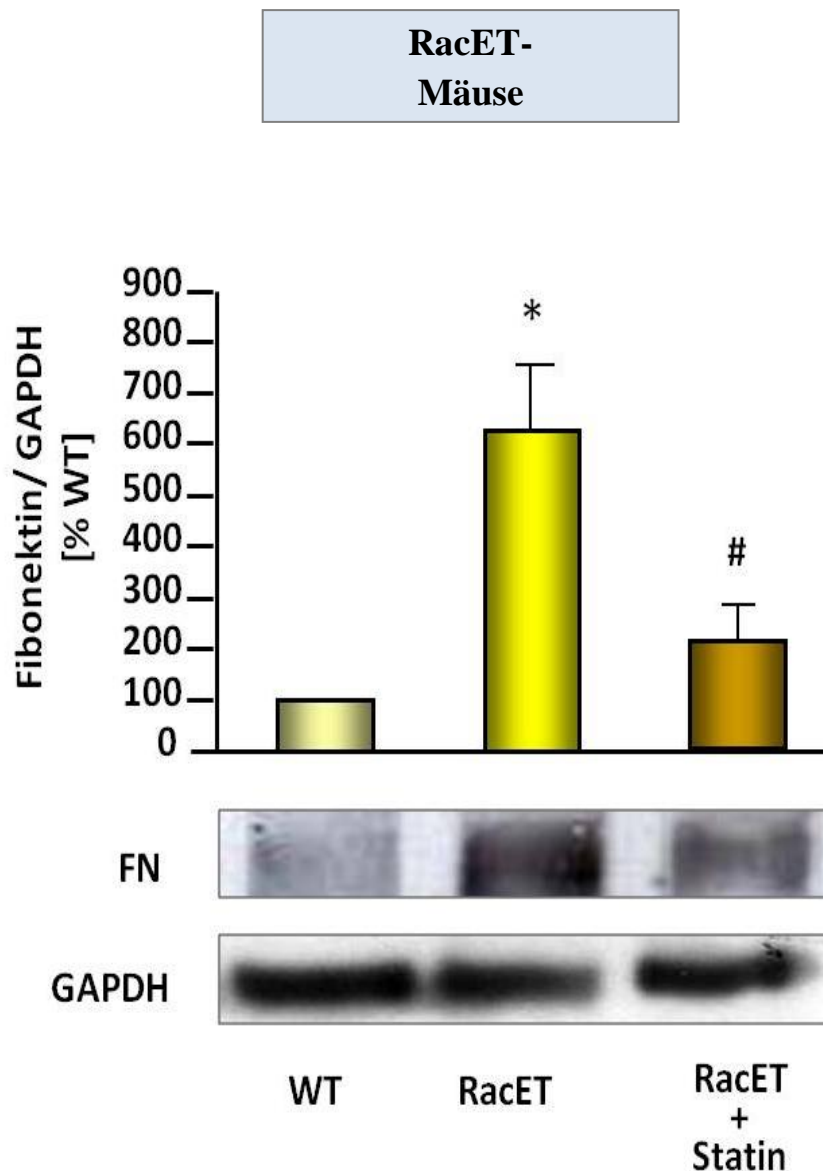
### Neonatale kardiale Rattenfibroblasten



### Regulation des Fibronectin-Proteingehalts in neonatalen kardialen Rattenfibroblasten durch AngII-, CTGF- und LOX-Aktivitätsmodulation

Die Quantifizierung der Western Blot-Analysen aus neonatalen kardialen Rattenfibroblasten zeigte eine Beeinflussung der Fibronectin-Expression, im Vergleich zu der von GAPDH, durch mehrere Regulatormoleküle: Die Behandlung der myokardialen Zellen mit AngII (1yM für 3 Std.) ergab eine signifikante Expressionssteigerung des Fibronectin-Proteins (n=5, \*p<0,05 vs. Kontrolle (C)), ebenso die Behandlung mit rekombinantem CTGF (n=5, \*\*p<0,05). Beide Effekte wurden durch Präinkubation mit dem spezifischen LOX small molecule inhibitor b-aminopropionitrile (BAPN, 100nM für 21Std.) fast vollständig verhindert (n=5, #p<0,05 vs. AngII, ##p<0,05 vs. CTGF). Darunter: Repräsentativer Fibronectin-Western Blot verglichen mit entsprechender GAPDH-Proteinladekontrolle.

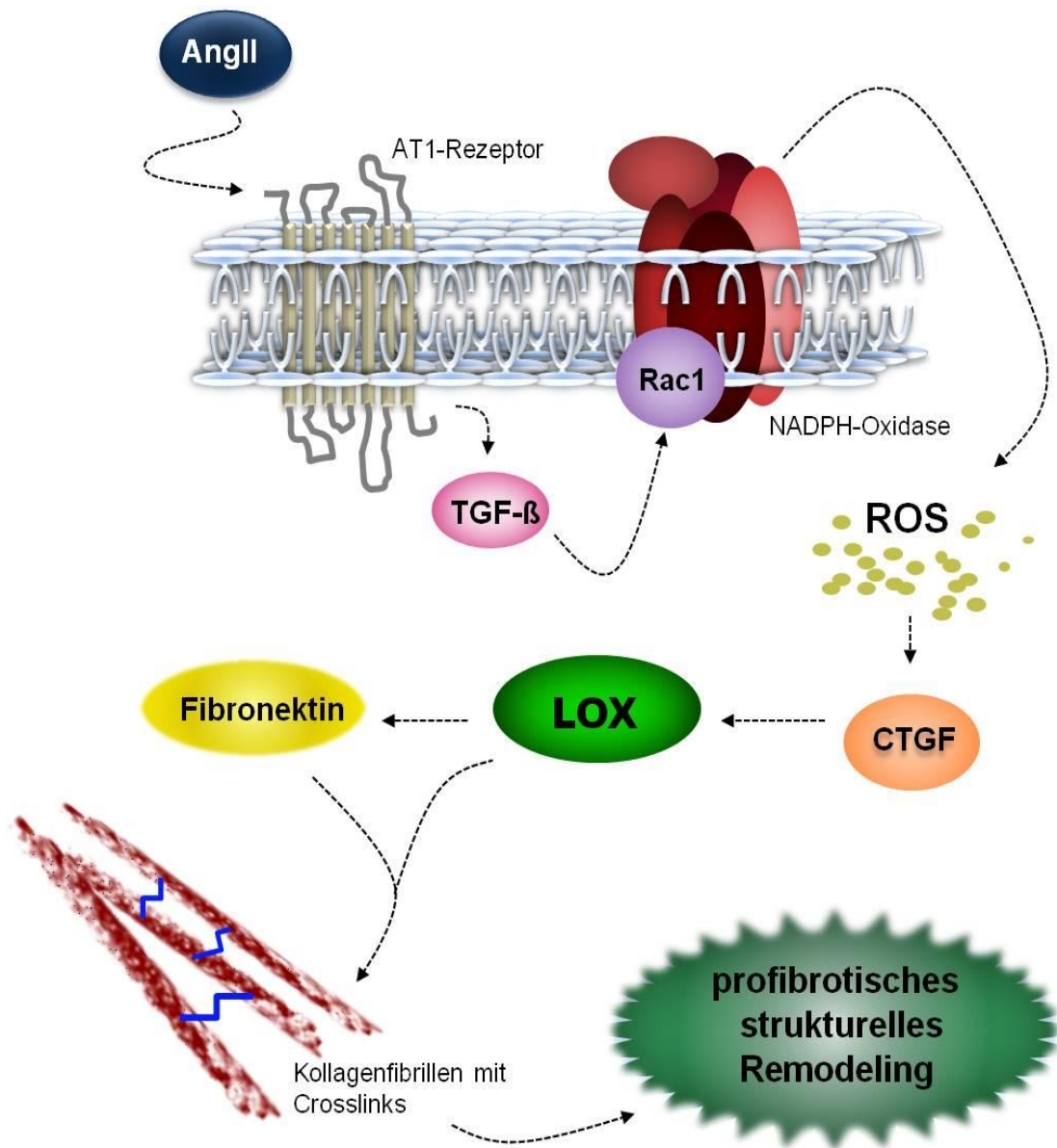
## Abbildung 19



### Reduktion der Fibronectin-Expression durch Statinbehandlung *in vivo*

Die densitometrischen Analysen der Fibronectin-Expression im Vergleich zu der von GAPDH in transgenen Mäusen, die, kontrolliert durch den  $\alpha$ -myosin heavy chain (MHC) Promotor, kardiales konstitutiv aktives (V12) Rac1 überexprimieren (RacET), ergaben eine deutlich gesteigerte Expression von Fibronectin in den gentechnisch veränderten Tieren, verglichen mit den WT-Mäusen ( $n=5$  pro Gruppe,  $*p<0,05$  vs. WT). Durch Fütterung von Rosuvastatin (0,4mg/Tag p.o.) für 10 Monate an die RacET-Mäuse (RacET+Statin), konnte die Erhöhung des Fibronectin-Gehalts deutlich reduziert werden ( $n=5$ ,  $\#p<0,05$  vs. RacET). Darunter: Repräsentativer Fibronectin-Western Blot verglichen mit entsprechender GAPDH-Proteinladekontrolle.

## Abbildung 20



**Veränderte Expressionsmuster der Signaltransduktoren legen eine Beteiligung des Signalwegs an den strukturellen Umbaumechanismen des atrialen Myokards in der Genese von Vorhofflimmern nahe**

Die AngII getriggerte Stimulation von TGF-β vermag eine Lokalisationsänderung der small molecule GTPase Rac1 vom Zytosol zur Zellmembran zu induzieren. In der Folge wird die NADPH-Oxidase aktiviert, wodurch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, die wiederum, durch Vermittlung über den Botenstoff CTGF, die Synthese der Lysyl Oxidase steigern. Aufgrund des anschließenden vermehrten Crosslinkings der Kollagenfibrillen und der gleichzeitigen Aktivierung von Fibronectin werden profibrotische Remodelingprozesse im Vorhofmyokard begünstigt, die letztendlich entscheidend zu der Entstehung und der Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern beitragen (Kollagenfibrillen modifiziert aus [97]).

## 7. Literaturverzeichnis

1. Adam O, Frost G, Custodis F, Sussmann MA, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2007) Role of Rac1 GTPase activation in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 50:359-367
2. Adam O, Lavall D, Theobald K, Hohl M, Grube M, Ameling S, Sussman MA, Rosenkranz S, Kroemer HK, Schäfers HJ, Böhm M, Laufs U (2010) Rac1-induced connective tissue growth factor regulates connexin 43 and n-cadherin expression in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 55(5):469-80
3. Alexander RW (1995) Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 25:155-161
4. Allessie P, Ausma J, Schotten U (2002) Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 54:230-46
5. Armstrong PW, Stopps TP, Ford SE, De Bold AJ (1986) Rapid ventricular pacing in the dog: pathophysiologic studies of heart failure. *Circulation* 74:1075-1084
6. Assayang P, Carre F, Chevalier B, Dalcayre C, Mansier P, Swynghedauw B (1997) Compensated cardiac hypertrophy: arrhythmogenicity and the new myocardial phenotype. I. Fibrosis. *Cardiovasc Res* 34:439-44
7. Bangalore S, Yao SS, Chaudhry FA (2007) Role of left atrial size in risk stratification and prognosis of patients undergoing stress echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 50:1254-62
8. Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA (1994) Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort: The Framingham Heart Study. *JAMA* 271:840-844
9. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D (1998) Impact of atrial fibrillation on the risk of death: The Framingham Heart Study. *Circulation* 98(10):946-52
10. Blackshear JL, Odell JA (1996) Appendage obliteration to reduce stroke in cardiac surgical patients with atrial fibrillation. *Ann Thorac Surg* 61(2):755-9
11. Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF (2000) Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342(18):1350-8
12. Boak AM, Roy R, Berk J, Taylor L, Polgar P, Goldstein RH, Kagan HM (1994) Regulation of lysyl oxidase expression in lung fibroblasts by transforming growth factorbeta 1 and prostaglandine E2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:751-755
13. Boldt A, Wetzel U, Lauschke J, Weigl J, Gummert J, Hindricks G, Kottkamp H, Dheim S (2004) Fibrosis in left atrial tissue of patients with and without underlying mitral valve disease. *Heart* 90:400-405
14. Bosch RF, Scherer CR, Rub N, Wohrl S, Steinmeyer K, Haase H, Busch AE, Seipel L, Kühlkamp V (2003) Molecular mechanisms of early electrical remodeling: transcriptional downregulation of ion channel subunits reduces I (Ca,L) and I (to) in rapid atrial pacing in rabbits. *J Am Coll Cardiol* 41:858-869



15. Brilla CG, Reams GP, Maisch B, Weber KT (1993) Renin-angiotensin system and myocardial fibrosis in hypertension: regulation of the myocardial collagen matrix. *Eur Heart J Suppl J*:57-61
16. Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, Janicki JS (2006) The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg* 30:604-610
17. Brown JH, Del Re DP, Sussman MA (2006) The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res* 98(6):730-42
18. Bujia J (1995) Effect of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis in cultured human chondrocytes. *Laryngorhinootologie* 74(7):444-9
19. Burstein B, Qi XY, Yeh YH, Calderone A, Nattel S (2007) Atrial cardiomyocyte tachycardia alters cardiac fibroblast function: a novel consideration in atrial remodeling. *Cardiovasc Res* 76(3):442-52
20. Burstein B, Nattel S (2008) Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 51(8):802-809
21. Calderone A, Bel-Hadj S, Drapeau J, El-Helou V, Gosselin H, Clement R, Villeneuve L (2006) Scar myofibroblasts of the infarcted rat heart express natriuretic peptides. *J Cell Physiol* 207(1):165-73
22. Camelliti P, McCulloch AD, Kohl P (2005) Microstructured cocultures of cardiac myocytes and fibroblasts: a two-dimensional in vitro model of cardiac tissue. *Microsc Microanal* 11(3):249-59
23. Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, Nattel S (2004) Atrial ionic remodeling induced by atrial tachycardia in the presence of congestive heart failure. *Circulation* 110:1520-1526
24. Chaturvedi RR, Herron T, Simmons R, Shore D, Kumar P, Sathia B, Chua F, Vassiliadis E, Kentish JC (2010) Passive stiffness of myocardium from congenital heart disease and implications for diastole. *Circulation* 121:979-988
25. Chen K, Mehta JL, Li D, Joseph L, Joseph J (2004) Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res* 95(12):1167-73
26. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH (2000) CTGF expression is induced by TGF- $\beta$  in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 32:1805-1819
27. Chretien M, Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR (1987) Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin. *Biochem J* 243:195-203
28. Chugh SS, Blackshear JL, Shen WK, Hammill SC, Gersh BJ (2001) Epidemiology and natural history of atrial fibrillation: clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 37:371-378
29. Chun-Wah S, Chu-Pak L, Hung-Fat T (2003) Prevention of atrial fibrillation recurrence by statin therapy in patients with lone atrial fibrillation after successful cardioversion. *Am J Cardiol* 92:1343-1345
30. Conchaw AD, Fothergill-Gilmore LA, Hulmes DJ (1995) The proteolytic processing site of the precursor of prollysyl oxidase. *Biochem J* 306:279-284



31. Custodis F, Eberl M, Kilter H, Böhm M, Laufs U (2006) Association of RhoGDIalpha with Rac1-GTPase mediates free radical production during myocardial hypertrophy. *Cardiovasc Res* 71:342-351
32. Derakhchan K, Li D, Courtemanche M, Smith B, Brouillette J, Pagé PL, Nattel S (2001) Method for simultaneous epicardial and endocardial mapping of in vivo canine heart: application to atrial conduction properties and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12:548-55
33. Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425(6958):577-84
34. Di Donato A, Ghiggeri GM, Di Duca M, Jivotenko E, Acinni R, Campolo J, Ginevri F, Gusmano R (1997) Lysyl oxidase expression and collagen-crosslinking during chronic adriamycin nephropathy. *Nephron* 76:192-200
35. Dostal DE, Baker KM (1999) The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res* 85:643-655
36. Dudley SC, Jr., Hoch NE, McCann LA, Honeycutt C, Diamandopoulos L, Fukai T, Harrison DG, Dikalov SI, Langberg J (2005) Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation* 112:1266-1273
37. Eghbali M, Tomek R, Woods C, Bhambi B (1991) Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype: specific effect of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(3):795-9
38. Elias JA, Freundlich B, Adams S, Rosenbloom J (1990) Regulation of human lung fibroblast collagen production by recombinant interleukin-1, tumor necrosis factor, and interferon-gamma. *Ann N Y Acad Sci* 580:233-44.
39. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ (2006) Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440:1222-1226
40. Falk RH (2001) Atrial fibrillation. *N Engl J Med* 344:1067-1078
41. Fareh S, Villemaire C, Nattel S (1998) Importance of refractoriness heterogeneity in the enhanced vulnerability to atrial fibrillation induction caused by tachycardia-induced atrial electrical remodeling. *Circulation* 98:2202-2209
42. Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG (1995) Prevalence, age distribution and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med* 155:469-473
43. Fogelgren B, Polgar N, Szauter KM, Ujfaludi Z, Laczko R, Fong KS, Csiszar K (2005) Cellular fibronectin binds to lysyl oxidase with high affinity and is critical for its proteolytic activation. *J Biol Chem* 280:24690-24697
44. Ford CM, Li S, Pickering JG (1999) Angiotensin II stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells: Involvement of the AT1 receptor, transforming growth factor-beta and tyrosine phosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1843-1851
45. Frustaci A, Chimenti C, Belloci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A (1997) Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 96:1180-4

46. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Le Heuzey JY, Kay GN, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann S, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Halperin JL, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, Zamorano JL (2006) ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 114:e257-e354
47. Gacheru SN, Thomas KM, Murray SA, Csiszar K, Smith-Mungo LI, Kagan HM (1997) Transcriptional and post-transcriptional control of lysyl oxidase expression in vascular smooth muscle cells: effects of TGF-beta 1 and serum deprivation. *J Cell Biochem* 65(3):395-407.
48. Gilard GM, Kagan HM, Gilard VH (2001) Lysyl oxidase, the extracellular matrix-forming enzyme, in rat brain injury sites. *Neurosci Lett* 310:45-48
49. Gilard GM, Kagan HM, Gilard VH (2005) Evidence for increased lysyl oxidase, the extracellular matrix-forming enzyme, in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* 376:210-214
50. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV, Singer DE (2001) Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA* 285(18):2370-5
51. Goette A, Honeycutt C, Langberg JJ (1996) Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms. *Circulation* 94:2968-2974
52. Goette A, Arndt M, Rocken C, Spiess A, Staack T, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U (2000) Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans. *Circulation* 101:2678-2681
53. Goette A, Staack T, Rocken C, Arndt M, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U (2000) Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 35:1669-1677
54. Goto Y, Uchio-Yamada K, Anan S, Yamamoto Y, Ogura A, Manabe N (2005) Transforming growth factor-beta1 mediated up-regulation of lysyl oxidase in the kidneys of hereditary nephrotic mouse with chronic renal fibrosis. *Virchows Arch* 447(5):859-68
55. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141-1148
56. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494-501
57. Hamalainen ER, Jones TA, Sheer D, Taskinen K, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI (1991) Molecular cloning of lysyl oxidase and assignment of the gene to chromosome 5q23. *Genomics* 11:508-516

58. Hanna N, Cardin S, Leung TK, Nattel S (2004) Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 63:236-244
59. Hayashi K, Fong KS, Mercier F, Boyed CD, Csiszar K, Hayashi M (2004) Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during the development and growth of mouse tissues. *J Mol Histol* 35:845-855
60. Healey JS, Baranchuk A, Crystal E, Morillo CA, Garfinkle M, Yusuf S, Connolly SJ (2005) Prevention of atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 45:1832-1839
61. Heimer R, Bashey RI, Kyle J, Jimenez SA (1995) TGF-beta modulates the synthesis of proteoglycans by myocardial fibroblasts in culture. *J Mol Cell Cardiol* 27(10):2191-8
62. Heisel A, Jung J, Sen S, Stopp M, Bay W, Schiefer HJ (1993) Therapeutische Strategien bei Vorhofflimmern. Behandlung im Akutfall und bei chronischem Verlauf. *Krankenhausarzt* 66:406-413
63. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH (2007) Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117:3810-3820
64. Hnatkova K, Waktare J, Murgatroyd F, Guo X, Baiyan X, Camm A, Malik M (1998) Analysis of the cardiac rhythm preceding episodes of paroxysmal atrial fibrillation. *Am Heart J* 135:1010-1019
65. Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D (1993) The epidemiology of heart failure: The Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 22:6A-13A
66. Hong HH, Uzel MI, Duan C, Sheff MC, Trackman PC (1999) Regulation of lysyl oxidase, collagen and connective tissue growth factor by TGF-beta1 and detection in human gingiva. *Lab Invest* 79:1655-1667
67. Hornstra IK, Birge S, Starcher B, Bailey AJ, Mecham RP, Shapiro SD (2003) Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *J Biol Chem* 278(16):14387-93
68. Hulmes DJ (1992) The collagen superfamily—diverse structures and assemblies. *Essays Biochem* 27:49-67
69. Kagan HM, Vaccaro CA, Bronson RE, Tang SS, Brody JS (1986) Ultrastructural immunolocalization of lysyl oxidase in vascular connective tissue. *J Cell Biol* 103:1121-1128
70. Kagan HM, Trackman PC (1991) Properties and functions of lysyl oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:206-210
71. Kagan HM (1994) Lysyl oxidase: mechanism, regulation and relationship to liver fibrosis. *Pathol Res Pract* 190:910-919
72. Kagan HM, Li W (2003) Lysyl oxidase: properties, specificity and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* 88:660-672

73. Kanekar S, Hirozanne T, Terracio L, Borg TK (1998) Cardiac fibroblasts: form and function. *Cardiovasc Pathol* 7:127-133
74. Kawano H, Do YS, Kawano Y, Starnes V, Barr M, Law RE, Hsueh WA (2000) Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation* 101(10):1130-7
75. Kim YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B (2005) A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res* 97:629-636
76. Kingsley DM (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8(2):133-46
77. Konings K, Kirchhof C, Smeets J, Wellens H, Penn O, Allessie M (1994) High-density mapping of electrically induced atrial fibrillation in humans. *Circulation* 89:1665-1680
78. Korantzopoulos P, Kolettis T, Siogas K, Goudevenos J (2003) Atrial fibrillation and electrical remodeling: the potential role of inflammation and oxidative stress. *Med Sci Monit* 9:RA225-RA229
79. Korantzopoulos P, Kolettis TM, Galaris D, Goudevenos JA (2007) The role of oxidative stress in the pathogenesis and perpetuation of atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 115:135-143
80. Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D (1996) Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch* 429:311-322
81. Kumar R, Singh VP, Baker KM (2008) The intracellular renin-angiotensin system: implications in cardiovascular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:168-173
82. Kupari M, Koskinen P (1991) Time of onset of supraventricular tachyarrhythmia in relation to alcohol consumption. *Am J Cardiol* 67:718-722
83. Laufs U, Kilter H, Konkol C, Wassmann S, Böhm M, Nickenig G (2002) Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc Res* 53:911-920
84. Lawrence DA (1996) Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw* 7(3):363-74
85. Leask A (2007) TGFβ, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res* 74:207-212
86. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S (1999) Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 100:87-95
87. Li D, Shinagawa K, Pang L, Leung TK, Cardin S, Wang Z, Nattel S (2001) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation* 104:2608-2614
88. Liao JK, Laufs U (2005) Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:89-118
89. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH (2000) Induction of cardiac fibrosis by angiotensin II. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 22:709-723

90. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH (2001) Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype I receptors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2:117-122
91. Lin CS, Lai LP, Lin JL, Sun YL, Hsu CW, Chen CL, Mao SJ, Huang SK (2007) Increased expression of extracellular matrix proteins in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 4:938-49
92. Lin PH, Lee SH, Su CP, Wei YH (2003) Oxidative damage to mitochondrial DNA in atrial muscle of patients with atrial fibrillation. *Free Radic Biol Med*. 35:1310-1318
93. Lopez B, Gonzalez A, Hermida N, Valencia F, de Teresa E, Diez J (2010) Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H1-H9
94. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
95. Lucero HA, Kagan HM (2006) Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci* 63:2304-2316
96. Lutz M, Knaus P (2002) Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal* 14(12):977-88.
97. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schäfers HJ, Nickenig G, Böhm M, Laufs U (2003) Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation* 108(13):1567-74
98. Magnusson MK, Mosher DF (1998) Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(9):1363-70
99. Majora M, Wittkamp T, Schuermann B, Schneider M, Franke S, Grether-Beck S, Wilichowski E, Bernerd F, Schroeder P, Krutmann J (2009) Functional consequences of mitochondrial DNA deletions in human skin fibroblasts: increased contractile strength in collagen lattices is due to oxidative stress-induced lysyl oxidase activity. *Am J Pathol* 175:1019-1029
100. Mäki JM, Räsänen J, Tikkanen H, Sormunen R, Mälikallio K, Kivirikko KI, Soininen R (2002) Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation* 106(19):2503-9
101. Massagué J, Cheifetz S, Boyd FT, Andres JL (1990) TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann N Y Acad Sci* 593:59-72
102. Matsui Y, Sadoshima J (2004) Rapid upregulation of CTGF in cardiac myocytes by hypertrophic stimuli: implication for cardiac fibrosis and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 37:477-481
103. Moe GK (1962) On the multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. *Arch Int Pharmacodyn* 140:183-188
104. Molnar J, Fong KS, He QP, Hayashi K, Kim Y, Fong SF, Fogelgren B, Szauter KM, Mink M, Csiszar K (2003) Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim Biophys Acta* 1647:220-224

105. Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM (1995) Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* 91:1588-1595
106. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24(6):954-8, 960, 962
107. Moussad EE, Brigstock DR (2000) Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* 71:276-292
108. Nag AC (1980) Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* 28(109):41-61.
109. Nattel S (2002) New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 415:219-226
110. Nattel S, Opie LH (2006) Controversies in atrial fibrillation. *Lancet* 367:262-72
111. Nellaiappan K, Risitano A, Liu G, Nicklas G, Kagan HM (2000) The fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 79:576-582
112. Ozaydin M, Varol E, Aslan SM, Kucuktepe Z, Dogan A, Ozturk M, Altinbas A (2006) Effect of atorvastatin on the recurrence rates of atrial fibrillation after electrical cardioversion. *Am J Cardiol* 97(10):1490-3
113. Panchenko MV, Stetler-Stevenson WG, Trubetskoy OV, Gacheru SN, Kagan HM (1996) Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysin oxidase: potential role of procollagen-C-proteinase. *J Biol Chem* 271:7113-7119
114. Pankov R, Yamada KM (2002) Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115:3861-3863
115. Papachroni KK, Piperi C, Levidou G, Korkolopoulou P, Pawelczyk L, Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG (2010) Lysyl oxidase interacts with AGEs signaling to modulate collagen synthesis in polycystic ovarian tissue. *J Cell Mol Med* 14(10):2460-9
116. Patti G, Chello M, Candura D, Pasceri V, D'Ambrosio A, Covino E, Di Sciascio G (2006) Randomized trial of atorvastatin for reduction of postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery: results of the ARMYDA-3 (Atorvastatin for Reduction of MYocardial Dysrhythmia After cardiac surgery) study. *Circulation* 114(14):1455-61
117. Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, Seftor EA, Wiley EL, Fong SF, Csiszar K, Hendrix MJ, Kirschmann DA (2005) Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res* 65:11429-11436
118. Pearlman ES, Weber K, Janicki JS, Pietra GG, Fishman AP (1982) Muscle fiber orientation and connective tissue content in the hypertrophied human heart. *Lab Invest* 46:158-164
119. Prockop DJ, Kivirikko KI (1995) Collagens: Molecular biology, diseases and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64:403-434



120. Ramdat M, Anand R, Opthof T, Van Hemel NM, Defauw JJ, De Bakker J, Janse MJ, Van Capelle F (1992) Increased dispersion of refractoriness in patients with idiopathic paroxysmal atrial fibrillation. *J Am Coll Card* 19:1531-1535
121. Reiser K, McCormick RJ, Rucker RB (1992) Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *FASEB J* 6:2439-2449
122. Roberts AB, Flanders KC, Heine UI, Jakowlew S, Kondaiah P, Kim SJ, Sporn MB (1990) Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 327(1239):145-54
123. Robinson TF, Geraci MA, Sonnenblick EH, Factor SM (1988) Coiled perimysial fibers of papillary muscle in rat heart: morphology, distribution and changes in configuration. *Circ Res* 63:577-592
124. Rodriguez C, Raposo B, Martinez-Gonzalez J, Casani L, Badimon L (2002) Low density lipoproteins down-regulates lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1409-1414
125. Rodriguez C, Martinez-Gonzalez J, Raposo B, Alcudia JF, Guadall A, Badimon L (2008) Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 79:7-13
126. Rodriguez C, Rodriguez-Sinovas A, Martinez-González J (2008) Lysyl oxidase as a therapeutic target. *Drug News Perspect* 21(4):218-224
127. Rodríguez C, Alcudia JF, Martínez-González J, Guadall A, Raposo B, Sánchez-Gómez S, Badimon L (2009) Statins normalize vascular lysyl oxidase down-regulation induced by proatherogenic risk factors. *Cardiovasc Res* 83(3):595-603
128. Rosenkranz S, Amann K, Caglayan E, Teimann K, Schlüter KD, Koteliensky V, Bäumer AT (2003)  $\beta$ -adrenoceptor-blockade prevents cardiac hypertrophy and failure in TGF- $\beta$  transgenic mice. *Eur J Heart* 24 (Supl.(Abstract)):665
129. Rupérez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M (2003) Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation* 108(12):1499-505
130. Rupérez M, Rodrigues-Díez R, Blanco-Colio LM, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Esteban V, Carvajal G, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M (2007) HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin II-induced vascular fibrosis: role of RhoA/ROCK and MAPK pathways. *Hypertension* 50 (2):377-83
131. Sack S (2002) Epidemiologie des Vorhofflimmerns. *Herz* 27:294-300
132. Samuel SK, Hurta RA, Kondaiah P, Khalil N, Turley EA, Wright JA, Greenberg AH (1992) Autocrine induction of tumor protease production and invasion by a metallothionein-regulated TGF-beta 1 (Ser223, 225). *EMBO J* 11(4):1599-605
133. Sanfilippo AJ, Abascal VM, Sheehan M, Oertel LB, Harrigan P, Hughes RA, Weyman AE (1990). Atrial enlargement as a consequence of atrial fibrillation. A prospective echocardiographic study. *Circulation* 82(3):792-7
134. Saygili E, Rana OR, Saygili E, Reuter H, Frank K, Schwinger RH, Müller-Ehmsen J, Zobel C (2007) Losartan prevents stretched-induced electrical remodeling in cultured atrial neonatal myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H2898-2905

135. Schmitt C, Ndrepepa G, Weber S, Schmieder S, Weyerbrock S, Schneider M, Karch MR, Deisenhofer I, Schreieck J, Zrenner B, Schömig A (2002) Batrial multiside mapping of atrial premature complexes triggering onset of atrial fibrillation. *Am J Card* 89:1381-1387
136. Schuessler RB, Grayson TM, Bromberg BI, Cox JL, Boineau JP (1992) Cholinergically mediated tachyarrhythmias induced by a single extrastimulus in the isolated canine right atrium. *Circ Res* 71:1254-1267
137. Seeland U, Haeuseler C, Hinrichs R, Rosenkranz S, Pfitzner T, Scharffetter-Kochanek K, Böhm M (2002) Myocardial fibrosis in transforming growth factor-beta(1) (TGF-beta(1)) transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase. *Eur J Clin Invest* 32(5):295-303
138. Sekiguchi K, Li X, Coker M, Flesch M, Barger PM, Sivasubramanian N, Mann DL (2004) Cross-regulation between the renin-angiotensin-system and inflammatory mediators in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 63:433-442
139. Shanley CJ, Gharaee-Kermani M, Sarkar R, Welling TH, Kriegel A, Ford JW, Stanley JC, Phan SH (1997) Transforming growth factor-beta 1 increases lysyl oxidase enzyme activity and mRNA in rat aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 25(3):446-52
140. Shiroshita-Takeshita A, Schram G, Lavoie J, Nattel S (2004) Effect of Simvastatin and antioxidant vitamins on atrial fibrillation promotion by atrial-tachycardia remodeling in dogs. *Circulation* 110:2313-2319
141. Sibon I, Sommer P, Lamaziere JM, Bonnet J (2005) Lysyl oxidase deficiency: a new cause of human arterial dissection. *Heart* 91:e33
142. Silver MA, Pick R, Brilla CG, Jalil JE, Janicki JS, Weber KT (1990) Reaktive and reparative fibrillar collagen remodeling in the hypertrophied rat left ventricle: two experimental models of myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res* 24:741-7
143. Siu CW, Lau CP, Tse HF (2003) Prevention of atrial fibrillation recurrence by statin therapy in patients with lone atrial fibrillation after successful cardioversion. *Am J Cardiol* 92(11):1343-5
144. Sivakumar P, Gupta S, Sarkar S, Sen S (2008) Upregulation of lysyl oxidase and MMPs during cardiac remodeling in human dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 307(1-2):159-67
145. Skorstengaard K, Jensen MS, Sahl P, Petersen TE, Magnusson S (1986) Complete primary structure of bovine plasma fibronectin. *Eur J Biochem* 161:441-453
146. Smith-Mungo LI, Kagan HM (1998) Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol* 16:387-398
147. Sottile J, Hocking DC (2002) Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell* 13(10):3546-59
148. Souders CA, Bowers SL, Baudino TA (2009) Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res* 105(12):1164-76
149. Spach MM, Dolber PC, Heidlage JF (1989) Interaction of inhomogeneities of repolarization with anisotropic propagation in dog atria: a mechanism for both preventing and initiating reentry. *Circulation Res* 65:1612-1631



150. Sussman MA, Welch S, Walker A, Klevitsky R, Hewett TE, Price RL, Schaefer E, Yager K (2000) Altered focal adhesion regulation correlates with cardiomyopathy in mice expressing constitutively active rac1. *J Clin Invest.* 105:875-886
151. Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakaze M, Liao JK (2001) Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 108(10):1429-37
152. Tang HT, Cheng DS, Jia YT, Ben DF, Ma B, Lv KY, Wie D, Sheng ZY, Xia ZF (2009) Angiotensin II induces type I collagen gene expression in human dermal fibroblasts through an AP-1/TGF- $\beta$ 1-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 385(3):418-423
153. Tinker D, Rucker RB (1985) Role of nutrients in the synthesis, accumulation and chemical modification of connective tissue proteins. *Physiol Rev* 65:607-651
154. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(5):349-63
155. Trackman PC, Pratt AM, Wolanski A, Tang SS, Offner GD, Troxler RT, Kagan HM (1990) Cloning of rat aorta lysyl oxidase cDNA:complete codons and predicted amino acid sequence. *Biochem* 29:4863-4870
156. Tsai CT, Lai LP, Kuo KT, Hwang JJ, Hsieh CS, Hsu KL, Tseng CD, Tseng YZ, Chiang FT, Lin JL (2008) Angiotensin II activates signal transducer and activators of transcription 3 via Rac1 in atrial myocytes and fibroblasts: implication for the therapeutic effect of statin in atrial structural remodeling. *Circulation* 117(3):344-55
157. Tsang T, Gersh BJ (2002) Atrial fibrillation:An old disease, a new epidemic. *Am J Cardiol* 113:432-435
158. Tzortzaki EG, Tischfield JA, Sahota A, Siafakas NM, Gordon MK, Gerecke DR (2003) Expression of FACIT collagens XII and XIV during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 275:1073-1080
159. Valenick LV, Hsia HC, Schwarzbauer JE (2005) Fibronectin fragmentation promotes  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin-mediated contraction of a fibrin-fibronectin provisional matrix. *Experimental cell res* 309:48-55
160. Van der Velden HM, Van Kempen MJ, Wijffels MC, Zijverden M, Groenewegen WA, Allessie MA, Jongsma HJ (1998) Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat. *J Cardiovasc Electrophysiol* 9:596-607
161. Vaziri SM, Larsen MG, Benjamin EJ, Levy D (1994) Echocardiographic predictors of nonrheumatic atrial fibrillation: The Framingham Heart Study. *Circulation* 89:724-730
162. Velling T, Risteli J, Wennerberg K, Mosher DF, Johansson S (2002) Polymerization of type I and III collagens on fibronectin and enhanced by Integrins  $\alpha$ 11 $\beta$ 1 and  $\alpha$ 2 $\beta$ 1. *J Biolog Chem* 277:37377-37481
163. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA (2004) Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ Res* 95(3):253-60

164. Wang SX, Mure M, Medzihradsky KF, Burlingame AL, Brown DE, Dooley DM, Smith AJ, Kagan HM, Klinman JP (1996) A crosslinked cofactor in lysyl oxidase:redox finction for amino acid side chains. *Science* 273:1078-1084
165. Weber KT (1989) Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 13:1637-1652
166. Weber KT (2004) Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens* 22:47-50
167. Wenzel S, Taimor G, Piper HM, Schluter KD (2001) Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB J* 15:2291-2293
168. Wierzbicka-Patynowski I, Schwarzbauer JE (2003) The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *Journal of cell science* 116:3269–76
169. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA (1995) Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 92(7):1954-68
170. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB (1991) Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: The Framingham study. *Stroke* 22:983-988
171. Wyndham CR (2000) Atrial Fibrillation: The Most Common Arrhythmia. *Tex Heart Inst J* 27(3):257–67
172. Xu J, Cui G, Esmailian F, Plunkett M, Marelli D, Ardehali A, Odum J, Laks H, Sen L (2004) Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation. *Circulation* 109:363-368
173. Yamashita T, Sekiguchi A, Kato T, Tsuneda T, Iwasaki Y, Sagara K, Iinuma H, Sawada H, Aizawa T (2007) Angiotensin type 1 receptor blockade prevents endocardial dysfunction of rapidly paced atria in rats. *JRAAS* 8:127-132

## Bücher

174. Klabund RE (2004) *Cardiovascular Physiology Concepts*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

## 8. Dank

„Wenn einer allein träumt, ist es nur ein Traum. Wenn viele gemeinsam träumen,  
ist das der Anfang einer neuen Wirklichkeit.“ (Friedensreich Hundertwasser)

In diesem Sinne möchte ich mich an dieser Stelle bei all denen Bedanken, die dabei mitgewirkt haben meinen Traum ein Stück näher in Richtung Wirklichkeit zu rücken. Ohne methodische, moralische, beratende oder freundschaftliche Hilfen eurerseits hätte ich dieses Ziel womöglich aus den Augen verloren. Ihr ward gleichzeitig Motor, Antrieb und Lenkung in einem für mich unheimlich spannenden Rennen um die Trophäe der Promotion – ein Mc-Laren Mercedes unter den Arbeitsgruppen, der seinen Fahrer erfolgreich über die Ziellinie getragen hat! Vielen Dank dafür!

Mein besonderer Dank gebührt zu allererst Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Laufs, zum einen für die freundliche Überlassung des Themas, aber vor allem für seine uneingeschränkten supportiven Bemühungen im Hinblick auf die wissenschaftliche Betreuung. Eine stetige Konsultationsbereitschaft und konstruktive Kritikäußerung, eine außerordentliche fachliche, berufliche und persönliche Förderung, sowie die entsprechende Anerkennung erbrachter Leistungen, zeichnen einen erfolgreichen und aufmerksamen Teamchef aus, der eine Betätigung unter seiner Obhut in eine nicht-geahnte Produktivität führt. Der Verlauf meines Renngeschehens wurde maßgeblich durch diese Fähigkeiten meines Doktorvaters optimiert und dirigiert. Die Vorbeugung und Überwindung sog. Ermüdungsphasen sind in erster Linie seinem hervorragenden Motivationstalent zu verdanken und seine Weisheiten sicherlich auch auf weitere Lebensphasen übertragbar.

„Wichtig ist zunächst nicht was, sondern DASS man etwas tut. Die resultierenden Möglichkeiten sind enorm und der Stolz auf das Vollbrachte unersetzlich.“ - wie wahr!

Größter Dank geht auch an meinen wissenschaftlichen Betreuer Herrn Dr. Oliver Adam, der die Arbeit geboren und, unter Berücksichtigung einiger Kursänderungen, mit mir zusammen großgezogen hat. Als Chefkonstrukteur in einem langen, zum Teil mühsamen Gestaltungsprozess, ließ er mir die Möglichkeit an der Feinjustierung teilzuhaben. Das komplette Fahrwerk basiert auf seiner vielfältigen Unterstützung und seinem ideenreichen

Forschungsgeist. Stets konnte ich mich auf dieses Konstrukt verlassen, was mir die nötige Sicherheit zum Fortschritt garantierte. Ein unendliches Dankeschön für dein Verständnis und deine Hilfsbereitschaft!

Bei Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm möchte ich mich für seine Bereitschaft der Frischlingsaufnahme in die Weiten des Forschungsspektrums bedanken, sowie für die dazu nötige Verfügbarkeit der Räumlichkeiten.

Besonders hervorheben möchte ich die Arbeit meiner beiden Lehrmeisterinnen, den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Simone Jäger und Frau Ellen Becker. Ihr habt mir durch eure Engelsgeduld und offenen Augen und Ohren (sowie - nicht zu vergessen - Ellen's gene of maths-perfection) den Weg bis über die Streckenbegrenzung hinaus geebnet und dadurch in vielerlei Hinsicht erleichtert, woraus sich letztendlich mehr als nur eine Kollegialität entwickelt hat. Hiermit möchte ich mich gleichzeitig für eure Freundschaft bedanken, die auch hoffentlich nach Überschreiten der Ziellinie weiter Bestand haben wird! Ihr ward Trainer, Rennwagen und Boxenluder in einem!

Des Weiteren gilt mein Dank allen Ärzten, Doktoranden, Biologen, Medizinisch-Technischen Assistenten und wissenschaftlichen Mitarbeitern der kardiologischen Forschungsgruppe für die Präparation der Rennstrecke mit ihrem unersättlichen Optimismus und ihrer Anteilnahme an den forschungsspezifischen Tieflagen und Höhenflügen. Eure uneigennützigen Hilfestellungen und Wegweisungen, bei versehentlichem Abbiegen in Sackgassen, haben mir die Zeit, die ich mir euch verbringen dürfte, zu einer unvergesslichen gemacht!

---

Unendlichen Dank bedarf die Unterstützung durch meine Eltern, Gisela und Eckhard Theobald. Neben den finanziellen monatlichen Dopingkuren, die mir mein Studium überhaupt erst ermöglichten, waren es, gerade auf der Zielgeraden, ihre stetigen Motivationskünste, die mich auf dem rechten Weg geradeaus blicken ließen. Ihr Verständnis um die erforderliche Opferbereitschaft, sowie ihr Beistand in Krisenzeiten, entwickelten sich zur treibenden Kraft während meiner Fahrt durch die Ebenen von Pubmed und Co.. Ihr ward, seid und werdet immer der Sprit in meinem Tank bleiben!

Ein besonders dickes Dankeschön gilt Ingrid Schmitt, meiner treusorgenden Zweitmutter, deren Angebot von Rückhalt und Geborgenheit als unermesslich scheint. Als mein F1-Helm sorgte sie stets für die nötige Sicherheit während der teils turbulenten Fahrten und lenkte den Blick immer wieder aufs Wesentliche. Diese Qualitätskriterien erfüllst du mit Bestnote, wie so viele mehr...!

Last but not least möchte ich meiner Schwester Friederike Theobald für ihren Beistand und Zuspruch in jeglichen Lebenssituationen danken. Als meine Teamkollegin verbindet uns ein Band, aus dessen Intensität ich immer wieder neue Kraft, Mut und Hoffnung schöpfen kann. Trotz gleichem Benzin fährt jeder sein eigenes Rennen und am Ende freut man sich über jeden Etappensieg des anderen als wäre es sein eigener. Es ist diese unvergleichliche Beziehung zwischen Geschwistern, die ich niemals missen möchte!

